

Aus dem Hygiene-Institut  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**DER EINFLUSS EINIGER VARIABLEN  
IN DER METHODIK  
EINES NEUEN PRÜFVERFAHRENS  
FÜR FLÄCHENDESINFEKTIONSMITTEL**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von  
**Margot Menzel**  
aus Kiel

Mainz 1979





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552618\\_0040](https://archive.org/details/IA41552618_0040)







Aus dem Hygiene-Institut  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**DER EINFLUSS EINIGER VARIABLEN  
IN DER METHODIK  
EINES NEUEN PRÜFVERFAHRENS  
FÜR FLÄCHENDESINFEKTIONSMITTEL**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von  
**Margot Menzel**  
aus Kiel

Mainz 1979



|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| Dekan:        | Professor Dr. H. Leithoff  |
| 1. Gutachter: | Professor Dr. J. Borneff   |
| 2. Gutachter: | Professor Dr. H.-P. Werner |

| Inhaltsverzeichnis | Seite                                                                                              |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.0                | Vorwort                                                                                            | 1  |
| 2.0                | Einleitung                                                                                         | 3  |
| 3.0                | Experimentelle Aufgabe                                                                             | 5  |
| 3.1.0              | Untersuchung von Einflußfaktoren zur Standardisierung der Methode                                  | 5  |
| 3.1.1              | Der Einfluß verschiedener Inaktivierungsmethoden                                                   | 5  |
| 3.1.2              | Der Einfluß verschiedener Vorkulturmedien                                                          | 6  |
| 3.1.3              | Der Einfluß verschiedener relativer Luftfeuchte                                                    | 6  |
| 3.2                | Anwendung der standardisierten Methode zur Bestimmung von Desinfektionsmittel-Grenzkonzentrationen | 7  |
| 4.0                | Material und Methode                                                                               | 7  |
| 4.1.0              | Allgemeine Methodik                                                                                | 8  |
| 4.1.1.0            | Material                                                                                           | 8  |
| 4.1.1.1            | Keimträger                                                                                         | 8  |
| 4.1.1.2            | Testkeime                                                                                          | 9  |
| 4.1.1.3            | Nährmedien                                                                                         | 9  |
| 4.1.1.4            | Standard-Desinfektionsmittel                                                                       | 10 |
| 4.1.1.5            | Inaktivierungsmedien                                                                               | 11 |
| 4.1.1.6            | Weitere Reagentien                                                                                 | 11 |
| 4.1.2.0            | Methode                                                                                            | 12 |
| 4.1.2.1            | Vorbereitung der Testflächen                                                                       | 12 |
| 4.1.2.2            | Vorbereitung der Testkeime                                                                         | 12 |
| 4.1.2.3            | Vorbereitung der Standard-Desinfektionsmittel                                                      | 13 |
| 4.1.2.4            | Vorbereitung der Nachkulturmedien                                                                  | 14 |
| 4.1.2.5            | Durchführung der Prüfung                                                                           | 15 |
| 4.1.2.6            | Auswertung                                                                                         | 16 |

|       |                                                                            | Seite |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.2.0 | Spezielle Methodik                                                         | 18    |
| 4.2.1 | Prüfung des Einflusses verschiedener Inaktivierungsmethoden                | 18    |
| 4.2.2 | Prüfung des Einflusses verschiedener Vorkulturmedien                       | 19    |
| 4.2.3 | Prüfung des Einflusses verschiedener relativer Luftfeuchte                 | 20    |
| 4.2.4 | Bestimmung von Desinfektionsmittel-Grenzkonzentrationen                    | 21    |
| 5.0   | Ergebnisse                                                                 | 22    |
| 5.1   | Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener Inaktivierungsmethoden | 22    |
| 5.2   | Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener Vorkulturmedien        | 37    |
| 5.3   | Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener relativer Luftfeuchte  | 40    |
| 5.4   | Ergebnisse der Bestimmung von Desinfektionsmittel-Grenzkonzentrationen     | 44    |
| 6.0   | Diskussion                                                                 | 50    |
| 7.0   | Empfehlungen                                                               | 57    |
| 8.0   | Zusammenfassung                                                            | 58    |
| 9.0   | Literaturverzeichnis                                                       | 61    |
| 10.0  | Abkürzungen                                                                | 64    |

## 1.0 Vorwort

Auf allen Gebieten der Medizin stellen heute spezifische Testverfahren die wichtigsten Hilfsmittel der Grundlagen für Forschung und Praxis dar.

Ein Test soll entscheidende Kriterien bei der Beurteilung eines Objektes oder einer Substanz liefern; wir fordern qualitativ oder quantitativ eindeutige, reproduzierbare Aussagen, von denen wir z.B. Maßnahmen der weiteren Diagnostik und Therapie, unsere nachfolgenden wissenschaftlichen Untersuchungen oder die Empfehlung eines Präparates für seinen Anwendungsbereich abhängig machen können. Dieser Forderung wird der Test umso eher gerecht, wenn Standardisierbarkeit ein wesentliches Merkmal seiner Methode ist.

In allen Bereichen der Medizin sind ständig Bemühungen vorhanden, neue Methoden von Testverfahren zu entwickeln, bestehende Methoden auf Aussagewert und Genauigkeit zu überprüfen. Die Desinfektionsmitteltestung bot den Medizinern seit Jahrzehnten ein ausgiebiges Betätigungsfeld der Entwicklung von Methoden.

Maßnahmen der Desinfektion sind in vielfältiger Weise in einem Klinikbetrieb oder in der Praxis notwendig, wie für Instrumente, Wäsche, Hände, Flächen, um nur einige Bereiche zu erwähnen. Die zu diesem Zwecke angewandten Mittel oder Verfahren müssen einer genauen Prüfung unterzogen werden.

Die Anforderungen, die an die Desinfektion als Verfahren zu stellen sind, ja die Definition des Begriffes Desinfektion selbst, waren bis vor wenigen Jahren uneinheitlich gefaßt und Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Bei dem II. Internationalen Colloquium zur

Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln 1972 in Hamburg wurde der Begriff Desinfektion von REBER (20) als Vorgang der "gezielten Entkeimung" definiert, "mit dem Zwecke, die Übertragung bestimmter unerwünschter Mikroorganismen ... zu verhindern". Ebenso wurden von SCHMIDT (25) die Anforderungen formuliert, die von einem Verfahren zur Desinfektion erfüllt werden müssen; erwähnt seien hier nur die wichtigsten aufgeführten Kriterien, wie desinfizierende Wirksamkeit, Unschädlichkeit für Mensch und Desinfektionsgut und Wirtschaftlichkeit. Diese Begriffsbestimmungen haben wesentlich zum besseren Verständnis der Prüfung von Desinfektionsverfahren und der Bedeutung ihrer Methoden beigetragen.

Ein Vergleich der verschiedenen zur Zeit gebräuchlichen Tests zeigt, daß die Kriterien der Standardisierbarkeit der Methode und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht ausreichend erfüllt sind, und daß sich die Aussagewerte erheblich unterscheiden (34).

An eine Untersuchung zum Zwecke der Beurteilung von Desinfektionsmitteln muß zudem die Forderung gestellt werden, daß eine Orientierung an der Praxis besteht, d.h. ein reiner Labortest (in vitro-Test) zur Bestimmung der Eignung eines Präparates ist als nicht ausreichend anzusehen und bedarf der Ergänzung durch praxisnahe Versuche (3).

Dies ist ein Beitrag zur Entwicklung einer standardisierten Methode zur Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen.

## 2.0 Einleitung

Ein Desinfektionsmittel soll unerwünschte Mikroorganismen in einer bestimmten Zeit derart schädigen, daß eine Übertragung verhindert wird. Die Prüfung muß quantitative Aussagen über Mittel und Erreger bezogen auf die Zeit liefern, d.h. feststellen, welche Konzentration des Mittels in welcher Zeit welche Keimzahlreduktion bewirkt. Daraus lassen sich Anwendungsempfehlungen für die Praxis ableiten. Eine Methode zur Bestimmung der Desinfektionsmittelwirkung muß daher Keimzahlreduktionen quantitativ erfassen (33).

Bei der Testung von Flächendesinfektionsmitteln werden Testflächen mit Erregern definierter Keimzahl kontaminiert, mit dem zu prüfenden Mittel desinfiziert, und die desinfizierende Wirkung bestimmt auf Grund der Zahl der von der Fläche rückgewonnenen überlebenden Keime. Diese lassen sich durch unterschiedliche Methoden nachweisen, wie durch Abstreichen der Testflächen mit einem Wattetupfer und anschließender Übertragung auf einen Nährboden (5), durch Abspülen der Flächen und Subkultur der Abspülflüssigkeit (26) oder durch Abdrücken mit dem zu bebrütenden Nährmedium selbst (z.B. "Rodac"-Verfahren, 35). Aus der Zahl der überlebenden Keime läßt sich unter Bezug auf die aufgebrachte Keimmenge die totale Keimreduktion bestimmen.

Das Absterben der Testorganismen ist nicht nur durch das Mittel selbst, sondern auch durch andere, von diesem unabhängige Vorgänge, wie Trocknung, verursacht, so daß wir zwischen Keimreduktion durch das Desinfektionsmittel, der tatsächlichen Desinfektionsmittelwirkung, und Reduktion auf Grund "natürlicher Absterbevorgänge", der "natürlichen Absterberate",

differenzieren müssen (33).

Die Problematik der Interpretation von Desinfektionsmittelprüfungen auf der Basis eines Wertes der totalen Keimreduktion ist wiederholt diskutiert worden (33). Das Abdruckverfahren mit der "Rodac"-Methode gestattet eine Bestimmung der tatsächlichen Desinfektionsmittelwirkung unter Berücksichtigung der "natürlichen Absterberate". Das "Rodac"-Verfahren ist, im Vergleich zu anderen Methoden, einfacher durchführbar, besser standardisierbar; es bietet ein geringeres Risiko beim Arbeiten mit Krankheitserregern, und die Ergebnisse sind gut reproduzierbar (4). Daher wurde es als Basis bei den Bemühungen um eine standardisierte Methode für die Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen gewählt.

Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen über die Variablen der Methodik, wie das Material des Keimträgers (35), das Suspensionsmedium der Testkeime (19), die Verdünnungsflüssigkeit des Desinfektionsmittels (19) und die Art der Rückkultur (35), und ihre Einflüsse hatten bereits die Festlegung mehrerer methodischer Einzelheiten ermöglicht.

Diese Arbeit sollte weitere Einflußgrößen in ihrem Effekt auf die "natürliche Absterberate" und vor allem auf die Desinfektionsmittelwirkung prüfen, damit die Methodik empfohlen werden kann. Die festgelegte Methodik sollte abschließend auf Exaktheit geprüft werden, indem sie zur Bestimmung der Desinfektionswirkungen dreier Standardpräparate in grenzwertigen Konzentrationen angewandt wurde.

### 3.0 Experimentelle Aufgabe

#### 3.1.0 Untersuchung von Einflußfaktoren zur Standardisierung der Methode

Bei diesen Versuchen (Versuchsserie I) sollten die Einflüsse von 3 verschiedenen Faktoren sowohl auf die "natürliche Absterberate", als auch vor allem auf die Desinfektionsmittelwirkung untersucht werden.

Die Versuchsanordnung ist so zu wählen, daß die Einzelaussätze sich lediglich in den zu prüfenden Variablen unterscheiden. Ein Vergleich der Keimrückgewinnungsraten ermöglicht dann eine Entscheidung für die jeweilige methodische Bedingung, die im Hinblick auf bessere Standardisierung zu empfehlen ist.

#### 3.1.1 Der Einfluß verschiedener Inaktivierungsmethoden

Als Inaktivierungsmittel (Enthemmer) bezeichnet man Substanzen bzw. Systeme von Substanzgemischen, die die Desinfektionsmittelwirkung neutralisieren.

Das Desinfektionsmittel soll Keime irreversibel schädigen; reversibel geschädigte Erreger sind als Ursache einer Übertragung nicht auszuschließen, das Mittel ist in diesem Falle in seiner desinfizierenden Eigenschaft, gemäß Definition, nicht ausreichend wirksam. Die Rückgewinnbarkeit dieser Erreger ist somit entscheidendes Kriterium bei der Wertbestimmung des Mittels. Reversibel geschädigte Keime müssen reaktiviert und ein weiterer Effekt von Desinfektionsmittelresten über die Prüfzeit hinaus muß verhindert werden,

um dem Mittel nicht fälschlich höhere bakterizide Eigenschaften zuzuordnen. Daher sind Inaktivierungsmittel unerläßliche Zusätze bei der Desinfektionsmitteltestung.

Sie können als auf die Testfläche aufgesprühte Flüssigkeit oder in dem zur Rückgewinnung der Keime verwendeten Nährboden mit den Desinfektionsmittelresten in Kontakt gebracht werden. Einflüsse solch unterschiedlicher Applikationsart waren Gegenstand dieser Versuche.

### 3.1.2 Der Einfluß verschiedener Vorkulturmedien

Die Art des Vorkulturmediums, sowie die Temperatur und Dauer der Bebrütung haben entscheidenden Einfluß auf die Resistenz einer Keimspezies gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteltypen (21), weshalb bei unseren Prüfbedingungen vergleichend zwei Arten von Nährmedien, ein festes und ein flüssiges, untersucht werden sollten.

### 3.1.3 Der Einfluß verschiedener relativer Luftfeuchte

Über den Einfluß unterschiedlicher relativer Luftfeuchte auf die Absterberate von Keimen sind bereits viele Untersuchungen geleistet worden (6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 24, 28, 30). Hier sollte dieser Faktor bei unserem Prüfverfahren hinsichtlich seines Einflusses sowohl auf die "natürliche Absterberate", als auch vor allem auf die Desinfektionsmittelwirkung bestimmt werden.

### 3.2 Anwendung der standardisierten Methode zur Bestimmung von Desinfektionsmittel-Grenzkonzentrationen

Als Grundlage der Bewertung eines Desinfektionsmittels wurde von mehreren Autoren (5, 14, 22) eine Keimzahlreduktion von 5 Zehnerpotenzen gefordert. Mit festgelegter Methodik sollten in abschließenden Versuchen (Versuchsserie II) drei Standard-Desinfektionsmittel auf dieses Wirksamkeitskriterium überprüft und durch Auswahl grenzwertiger Konzentrationen eine Aussage über die Exaktheit der Methode ermöglicht werden.

### 4.0 Material und Methode

Mit der "Rodac"-Methode lassen sich Keime auf Testflächen quantitativ nachweisen; durch 3 aufeinanderfolgende Abdrucke der Fläche mit Nährböden werden 92 - 98% der Keime rückgewonnen (35).

Jeder Versuch umfaßt sowohl einen Prüf-, als auch einen Kontrollansatz.

Die vorkultivierten Testkeime werden in einem Medium suspendiert und in definierter Menge auf Testflächen aufgebracht, welche, nach einer Antrocknungszeit der Keimsuspension, mit dem Desinfektionsmittel bestimmter Konzentration (Prüfansatz) bzw. mit Wasser standardisierter Härte (Kontrollansatz) behandelt werden. Nach der jeweiligen Einwirkungszeit werden zur Ermittlung des verbliebenen Keimgehaltes "Rodac"-Nährböden auf den Testflächen abgedrückt. Die nach Bebrütung gewachsenen koloniebildenden Einheiten werden gezählt; diese Werte bilden die Grundlage der Berechnung

der auf die "natürliche Absterberate" (Kontrollansatz) bezogenen tatsächlichen Desinfektionsmittelwirkung.

Die Gemeinsamkeiten von Material und Methode aller Versuchsserien seien zunächst dargestellt, die spezielle Methodik wird in den Einzelkapiteln erläutert.

#### 4.1.0 Allgemeine Methodik

##### 4.1.1.0 Material

##### 4.1.1.1 Keimträger

Bei der Prüfung von Flächendesinfektionsmitteln ist eine Einschränkung des Spektrums der Keimträgermaterialien eher zu vertreten als die der Testkeimarten. Entscheidende Kriterien bei der Auswahl einer Testfläche sind die stets gleichbleibende Beschaffenheit und die Gewährleistung hoher Rückgewinnungsraten. 50 x 50 mm große weiße, mattglasierte Steinzeugfliesen, sog. OP-Fliesen (Artikel-Nr. 3701/Farbe 500 der Keramischen Werke KG., Villeroy & Boch, Mettlach) hatten sich bei den Untersuchungen von WERNER et al. (35) als empfehlenswert erwiesen und wurden daher bei den hier beschriebenen Versuchen gewählt.

#### 4.1.1.2 Testkeime

Versuchsserie I : Staph. aureus NCTC 4163  
Klebs. pneumoniae I

Versuchsserie II : Staph. aureus ATCC 6538  
Klebs. pneumoniae ATCC 4352  
Strept. faecium  
E. coli ATCC 11229

#### 4.1.1.3 Nährmedien

Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar (CSA), Firma  
OXOID (CM 131)

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Caseinpepton         | 15,0 g    |
| Sojabohnenmehlpepton | 5,0 g     |
| Natriumchlorid       | 5,0 g     |
| Agar No. 3           | 15,0 g    |
| Aqua dest.           | 1000,0 ml |

pH des fertigen Nährbodens: 7,3

40 g des Pulvers wurden in 1 Liter frisch destilliertem Wasser unter Erhitzen gelöst. Höchstens 1 min kochen. Danach Sterilisation im Autoklaven 121°C/15 min. In heißem Zustand durch ausgiebiges Schütteln gut mischen. Je 20 ml des flüssigen, erhitzten Agars wurden in Petri-Schalen (Ø 8,5 cm), bzw. je 16 ml in "Rodac"-Platten (Ø 5,5 cm) gefüllt.

Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (CSL), Firma  
OXOID (CM 129)

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Caseinpepton         | 17,0 g    |
| Sojabohnenmehlpepton | 3,0 g     |
| Natriumchlorid       | 5,0 g     |
| Dikaliumphosphat     | 2,5 g     |
| Glucose              | 2,5 g     |
| Aqua dest.           | 1000,0 ml |

pH der fertigen Nährlösung: 7,3

30 g des Pulvers wurden unter Erhitzen in 1 Liter frisch destilliertem Wasser gelöst. Abfüllen in Röhrchen zu 10 ml. Sterilisation im Autoklaven 121°C/15 min.

#### 4.1.1.4 Standard-Desinfektionsmittel

Zur Anwendung gelangten keine Handelspräparate, nur Standard-Desinfektionsmittel, deren Zusammensetzung aber weitgehend den üblichen Flächendesinfektionsmitteln entspricht.

##### Phenol-Standard (Phenol-St.)

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| 2-Phenylphenol                       | 8,0%  |
| 3-Methyl-4-Chlorphenol (BAYER)       | 4,0%  |
| 2-Benzyl-4-Chlorphenol (BAYER)       | 3,0%  |
| Iso-Propanol (DEUTSCHE SHELL CHEMIE) | 15,0% |
| Mersolat W 93 (BAYER)                | 40,0% |
| n/10 Essigsäure (MERCK)              | 8,5%  |
| dest. Wasser                         | 21,5% |

2-Phenylphenol, 3-Methyl-4-Chlorphenol und 2-Benzyl-4-Chlorphenol wurden in Isopropanol suspendiert. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von Mersolat W 93, n/10 Essigsäure und dest. Wasser bis zur klaren Lösung. pH des Konzentrates: 8,0. pH einer 1%igen Lösung: 6,3.

##### Aldehyd-Standard (Aldehyd-St.)

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| Formaldehyd (30%ig, HÖCHST)   | 16,7% |
| Glyoxal (40%ig, BASF)         | 12,5% |
| Glutardialdehyd (50%ig, BASF) | 5,0%  |
| Lutensol ON 79 (BASF)         | 5,0%  |
| n/10 Natronlauge (MERCK)      | 2,0%  |
| dest. Wasser                  | 58,8% |

Unter Rühren wurden in eine Lösung von Lutensol ON 79 und dest. Wasser Formaldehyd, Glyoxal und Glutardialdehyd zugegeben und mit n/10 Natronlauge auf einen pH von 6 eingestellt. pH des Konzentrates: 6,0. pH einer 1%igen Lösung: 5,4.

##### Jodophor-Standard (Jodophor-St.)

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| Jod (MERCK)                   | 3,0%  |
| Lutensol SC 9224 (BASF)       | 30,0% |
| Phosphorsäure (75%ig, techn.) | 5,0%  |
| Wasser                        | 62,0% |

Nach Erwärmen (ca. 54°C) wurde unter ständigem Rühren das Jod bis zur vollständigen Lösung eingearbeitet. Um ein Sublimieren des Jods zu vermeiden, sollte dabei das Gefäß abgedeckt sein. Dann wurde zunächst Phosphorsäure und am Ende das Wasser zugegeben, wobei bis zur völligen Homogenität zu rühren ist. Das Produkt mußte vor der Abfüllung filtriert werden. pH des Konzentrates: 2,2. pH einer 2%igen Lösung: 1,7.

#### 4.1.1.5 Inaktivierungsmedien

##### Phenol-Inaktivierungsmittel

|                                                 |      |
|-------------------------------------------------|------|
| Polysorbate 80 (Tween 80, BBL)                  | 3,0% |
| Lecithin aus Eiern (MERCK)                      | 0,3% |
| Natriumlauryläthersulfat (Elfan NS 243 S, AKZO) | 0,4% |

##### Aldehyd-Inaktivierungsmittel

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Polysorbate 80 (Tween 80, BBL) | 3,0% |
| Lecithin aus Eiern (MERCK)     | 0,3% |
| L-Histidin (MERCK)             | 0,1% |

##### Jodophor-Inaktivierungsmittel

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Natrium-Cumolsulfonat (HÜLS)      | 7,0%  |
| Polysorbate 80 (Tween 80, BBL)    | 4,0%  |
| Inaktiviertes Rinderserum (OXOID) | 10,0% |

#### 4.1.1.6 Weitere Reagentien

Von KELSEY und SYKES (12) wurde zur Annäherung an die Praxis Wasser standardisierter Härte (WSH,  $17^{\circ}\text{dH} = 300 \text{ ppm}$ ) statt Aqua dest. als Verdünnungsflüssigkeit des Desinfektionsmittels vorgeschlagen. Es kam auch in den hier beschriebenen Versuchen zur Anwendung.

##### Rezeptur:

17,5 ml einer 10%igen Lösung (g/v)  $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  und  
5 ml einer 10%igen Lösung (g/v)  $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 3300 ml  
Aqua bidest. autoklavieren ( $121^{\circ}\text{C}/15 \text{ min}$ ).

#### 4.1.2.0 Methode

##### 4.1.2.1 Vorbereitung der Testflächen

Je 3 Testflächen bildeten eine Einheit identischer Behandlung bei identischer Einwirkungszeit (Einzelansatz). Bei 4 Zeiten wurden somit pro Prüfansatz (d.h. pro Desinfektionsmittel- (DIM-) Konzentration) bzw. pro Kontrollansatz (Verwendung von WSH)  $3 \times 4 = 12$  Keimträger verwendet.

Je 12 Fliesen wurden am Vortage des Versuches auf je 1 Resopal- oder Glasplatte aufgeklebt und mit 80%igem Äthylalkohol gründlich abgerieben. Der Alkohol erfüllte nicht nur den Zweck von Reinigung und Desinfektion, sondern diente auch der Entfettung, so daß eine gleichmäßige Verteilung der als Tropfen auf die Fliese aufgetragenen Keimsuspension ermöglicht wurde. Die vorbereiteten Keimträger wurden über Nacht in einem geschlossenen, staubarmen Raum gelagert.

##### 4.1.2.2 Vorbereitung der Testkeime

Die Testkeime wurden am Vortage des Versuches den Stammkulturen entnommen und auf das Vorkulturmedium überimpft. Angaben über dessen Art, CSA oder CSL, sind der speziellen Methodik zu entnehmen. Die Bebrütung erfolgte aerob bei  $37^{\circ}\text{C}$ , deren unterschiedliche Dauer, 18 oder 24 h, ebenfalls in den Spezialkapiteln aufgeführt ist.

Für die vor Versuchsbeginn zur Kontamination herzustellende Suspension diente stets CSL als Medium. Nach Abschwemmen der Subkultur auf CSA mit 10 ml CSL (bei Verwendung von CSL siehe unter 4.2.1) und 15minütigem

Stehen wurden von der Oberfläche 2 ml entnommen und zur Homogenisierung 5 min mit sterilen Glaskugeln geschüttelt.

Zur Bestimmung des Keimgehaltes dieser Ausgangssuspension erfolgte die Übertragung davon mittels physiologischer Kochsalzlösung hergestellter dekadischer Verdünnungsstufen auf CSA und anschließende Inkubation. Von je 3 Verdünnungsstufen wurden je 3 Oberflächenkulturen gewonnen. Die arithmetischen Mittelwerte der koloniebildenden Einheiten der 3 Oberflächenkulturen pro Verdünnungsstufe ließen auf den Keimgehalt der Ausgangssuspension schließen. Von dieser wurden durch dekadische Verdünnungsstufen mit CSL die zur Kontamination verwendeten Keimsuspensionen hergestellt, deren Gehalt somit ebenfalls bekannt war.

Die Kontaminationsdosis mußte so gewählt werden, daß die koloniebildenden Einheiten (KBE) der Nachkulturen im zählbaren Bereich (unter 500) lagen. Bevor eigene Erfahrungswerte vorhanden waren, konnte bei der Festlegung des Gehaltes der auf die Fliese aufzubringenden Keimsuspension auf die Ergebnisse früherer Untersuchungen (19, 33) zurückgegriffen werden. Bei den Kontrollansätzen mußten gemäß der Erwartung zählbarer Bereiche der KBE um einige Zehnerpotenzen niedrigere Keimgehalte gewählt werden. Die bei den einzelnen Versuchen zur Anwendung gelangten Keimgehalte der Suspensionen werden später aufgeführt.

#### 4.1.2.3 Vorbereitung der Standard-Desinfektionsmittel

Die Konzentrationen der Standard-Desinfektionsmittel (Zusammensetzungen siehe unter 4.1.1.4) wurden direkt vor Versuchsbeginn mit Wasser standardisierter Härte

(Zusammensetzung siehe unter 4.1.1.6) als Verdünnungsflüssigkeit angesetzt. Die in Versuchsserie I geprüften Konzentrationen (Angaben in v/v) waren: Phenol-St. 0,1% und Aldehyd-St. 0,25% bei beiden Keimarten, Jodophor-St. 0,25% bei Staph. aureus und 0,025% bei Klebs. pneumoniae. Die Konzentrationen der Versuchsserie II sind in der speziellen Methodik unter 4.2.4 aufgeführt.

#### 4.1.2.4 Vorbereitung der Nachkulturmedien

Zur Rückgewinnung der Keime wurde CSA (Zusammensetzung siehe unter 4.1.1.3) als Nährmedium verwandt, welchem das mittelspezifische Inaktivierungsmittel (Zusammensetzungen siehe unter 4.1.1.5) zugesetzt wurde, wobei auf Konstanthalten der Agarendkonzentration von 1,5% zu achten war.

Dies galt für Versuche mit Phenol- und Aldehyd-Standard. Da sich bei denjenigen mit Jodophor-Standard die Nährboden-Enthemmer-Kombination als ungünstige Wachstumsbedingung erwies, wurde bei Testung mit diesem Mittel nachfolgend stets CSA mit 5% Hammelblut verwendet, eine Kombination, die sich bereits bei früheren Prüfungen (33) als geeignete Ersatzmöglichkeit gezeigt hatte, und nur diese Versuche wurden gewertet.

Lediglich bei den Untersuchungen des Einflusses verschiedener Inaktivierungsmethoden (4.2.1) gelangte, wie unten im einzelnen erläutert, auch CSA ohne Enthemmerzusatz bei der Nachkultur zur Anwendung.

Der Agar wurde am Vortage des Versuches in die "Rodac"-Platten eingefüllt. Diese speziell konstruierten Plastikschaalen ermöglichen durch das leichte überragen des Nährbodens über den Schalenrand den Abdruck einer Kontaktkultur. Die mit je ca. 16 ml Agar gefüllten

"Rodac"-Platten wurden im Kühlraum bei  $+4^{\circ}\text{C}$  umgekehrt gelagert und vor Verwendung 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

#### 4.1.2.5 Durchführung der Prüfung

Alle Testflächen wurden während des gesamten Versuches waagrecht gelagert. Die im Versuchsraum stets gemessenen Werte von Temperatur und relativer Luftfeuchte betrugen  $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$  und  $33 \pm 8\%$  r.F.. Lediglich bei den Experimenten über den Einfluß der relativen Feuchte herrschten andere Bedingungen, welche unter 4.2.3 gesondert aufgeführt sind.

Die Kontamination der Testflächen erfolgte mittels Marburg-Pipetten mit je 0,1 ml der eingestellten Keimsuspension, welche mit sterilen Glasspateln (30 mm Kantenlänge) auf dem mittleren Areal von 30 x 30 mm gleichmäßig verteilt wurde, unter Verwendung je eines Spatels pro 3-Fliesen-Einzelansatz. Nach 90minütiger Antrocknungszeit wurden die Keimträger eines Prüfansatzes mit Desinfektionsmittel (DIM), diejenigen eines Kontrollansatzes mit Wasser standardisierter Härte (WSH) mit Hilfe von "Shandon-Unispray"-Treibgasflaschen aus einer Entfernung von ca. 40 cm bis zur Bildung eines geschlossenen Flüssigkeitsfilms besprüht. Die Entfernung sollte wegen der Gefahr des Absprühens von Keimen nicht geringer sein. Nach Einwirkungszeiten von 1, 2, 3 und 4 h, entsprechend den Empfehlungen von WERNER et al. (33) für die Prüfung von Flächendesinfektionsmitteln, wurden die Fliesen zum Nachweis des noch verbliebenen Keimgehaltes mit "Rodac"-Platten abgedrückt. Um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, war auf schräges Aufsetzen des Nährbodens, von einer

Ecke der Fläche her, zu achten. Die aufgelegte Platte wurde mit 200 g belastet und für 2 min belassen. Von jeder Fliese erfolgten 3 sofort aufeinanderfolgende Abdrucke mit je einem Nährboden. Pro Einzelansatz à 3 Keimträger wurden somit 9 Abdrucke genommen, bei 4 Zeiten wurden pro Desinfektionsmittel-Konzentration bzw. pro Kontrolle 36 Kontaktkulturen hergestellt.

Die "Rodac"-Platten wurden aerob bei 37°C mindestens während 16 h, bei geringem Wachstum bis zu 48 h bebrütet.

#### 4.1.2.6 Auswertung

Die KBE jeder "Rodac"-Platte wurden unter Verwendung eines Gerätes mit Lupenvergrößerung gezählt, bei Rasenwachstum wurde 2000 als Minimalwert festgelegt. Die Berechnung stützte sich auf eine frühere Untersuchung von WERNER (31), wonach die tatsächliche Desinfektionswirkung aus der Differenz von totaler Keimreduktion und "natürlicher Absterberate" bestimmt werden kann.

Mikrobielles Absterben, ob auf natürliche Weise oder durch Desinfektionsmittel ausgelöst, ist mathematisch als exponentieller Vorgang zu erfassen. Sollen Keimzahlen der aufgetragenen Keimmenge mit denen der rückgewonnenen KBE in Bezug gebracht werden, muß daher mit den Logarithmen der Keimzahlen gerechnet werden.

Die KBE der 3 aufeinanderfolgenden Abdrucke pro Testfläche wurden addiert, aus den Summen der KBE der 3 pro Einzelansatz verwendeten Keimträger arithmetische Mittel gebildet. Auf diese Weise ließ sich ein Einzelansatz von 9 Werten auf einen reduziert rechnerisch darstellen. Wir erhielten pro Einwirkungszeit  $t$  (Ein-

zelansatz) einen Wert der Keimzahlreduktion durch das Desinfektionsmittel D (Prüfansatz) und einen der Keimzahlreduktion als Ausdruck der "natürlichen Absterberate" K (Kontrollansatz).

Aus der Differenz des Logarithmus der aufgebrauchten Keimmenge und dem des KBE-Mittelwertes nach der betreffenden Zeit ergibt sich die "natürliche Absterberate". Die eigentliche Desinfektionswirkung stellt sich aus der Differenz des Logarithmus der totalen Keimreduktion und der "natürlichen Absterberate" dar.

Zusammengefaßt läßt sich die Berechnung der tatsächlichen Desinfektionswirkung in folgender Formel wiedergeben (33):

$$KR_t = \log_{10} (N_K \times 10^F) - \log_{10} N_D$$

$KR_t$  = Keimzahlreduktion (log.) durch das Desinfektionsmittel nach der Einwirkungszeit t

$N_K$  = Mittelwert der 3 Summen der Koloniezahlen der 3 aufeinanderfolgenden Abdrucke in den Kontrollen (mit WSH)

F = Differenz in log. (Verdünnungsstufen) zwischen der aufgebrauchten Keimmenge auf den Testflächen für die Desinfektionsmittelapplikation und der der Kontrollen (mit WSH)

$N_D$  = Mittelwert der 3 Summen der Koloniezahlen der 3 aufeinanderfolgenden Abdrucke nach der Desinfektionsmitteleinwirkung.

Basierte mindestens einer der 9 dem arithmetischen Mittel zugrundeliegenden KBE-Werte auf dem Minimalwert 2000 infolge Rasenwachstums, so wurde die Berechnung analog ausgeführt, welche dann jedoch keinen genauen Wert ergibt, sondern lediglich die Angabe eines Höchstbereiches ermöglicht, unter dem die tatsächliche Desinfektionswirkung liegt.

#### 4.2.0 Spezielle Methodik

##### 4.2.1 Prüfung des Einflusses verschiedener Inaktivierungsmethoden

Art der verwendeten Keimträger und Testkeime, sowie Zusammensetzungen der Nährmedien, Desinfektionsmittel-Standards, Inaktivierungsmittel und sonstiger Reagentien sind unter 4.1.1.0 beschrieben, die Vorbereitung der Testflächen (siehe unter 4.1.2.1) erfolgte analog.

Vorkulturmedium war CSL, in welche die Testkeime am Vortage überimpft und 18 h aerob bei 37°C bebrütet wurden. Von dieser Ausgangssuspension wurden durch Verdünnungsstufen in CSL die Kontaminations-Suspensionen hergestellt, welche bei Staph. aureus Gehalte zwischen  $3,3 \times 10^6/10^3$  und  $7,1 \times 10^7/10^3$  Keimen/ml, bei Klebs. pneumoniae zwischen  $5 \times 10^6/10^3$  und  $8,67 \times 10^6/10^3$  Keimen/ml hatten (Angaben der höheren Werte ( $10^6$  bzw.  $10^7$ ) für den Prüf-, der niedrigeren ( $10^3$ ) für den Kontrollansatz).

Die aufzusprühende Inaktivierungsflüssigkeit enthielt die 3 Substanzkombinationen in 0,1%iger Trypton-Aqua dest.-Lösung. Trypton sollte einen stabilisierenden Effekt auf die Keime nach dem Aufsprühen ausüben.

Wir unterschieden 5 Versuchsansätze:

##### 1. Ohne Aufsprühen

- 1.1 Nährböden mit Inaktivierungsmittel (Inakt.-Mittel),
- 1.2 Nährböden ohne Inakt.-Mittel.

##### 2. Mit Aufsprühen

- 2.1 von Inakt.-Mittel, Nährböden mit Inakt.-Mittel,
- 2.2 von Inakt.-Mittel, Nährböden ohne Inakt.-Mittel,
- 2.3 von Trypton, Nährböden mit Inakt.-Mittel.

Der Ansatz mit Trypton diene als Kontrolle auf eine eventuelle Keimreduktion durch den Sprühvorgang als solchen.

Jeder Versuchsansatz bestand wie üblich aus Prüf- (DIM-) und Kontroll- (WSH-)anteil.

Die Vorbereitung der Nachkulturmedien erfolgte wie unter 4.1.2.4 beschrieben, wobei 2/5 der zu gießenden Nährböden aus CSA ohne Enthemmerzusatz bestanden.

Die kontaminierten, desinfizierten bzw. mit WSH behandelten Testflächen wurden nach der bestimmten Einwirkungszeit bei den Versuchsansätzen ohne Aufsprühen, wie unter 4.1.2.5 angegeben, mit "Rodac"-Nährböden abgedrückt, bei der anderen Gruppe jedoch erfolgten dann das Aufsprühen des Inaktivierungsmittels bzw. von Trypton mittels "Shandon-Unispray"-Treibgasflaschen aus ca. 40 cm Entfernung bis zur Bildung eines geschlossenen Flüssigkeitsfilms, sowie der Abdruck der Flächen nach einer Antrocknungszeit von 90 min.

Vergleichende Vorversuche hatten ergeben, daß eine solche von 30 min nicht ausreichend war und wegen der technischen Schwierigkeit des Herstellens eines Abdruckes bei auf der Fliese verbliebenem Flüssigkeitsrest zu fehlerhafter Bewertung hätte führen können.

#### 4.2.2 Prüfung des Einflusses verschiedener Vorkulturmedien

Art der Keimträger und Testkeime, sowie Zusammensetzungen der verwendeten Substanzen sind unter 4.1.1.0 beschrieben, die Vorbereitung der Fliesen (siehe unter 4.1.2.1) erfolgte analog.

Die Testkeime wurden am Vortage einerseits auf CSA, andererseits in CSL überimpft und 18 h bei 37°C bebrütet. Die auf CSA kultivierten Keime wurden mit CSL, wie unter 4.1.2.2 angegeben, abgeschwemmt und durch Weiterverdünnung mit CSL auf den Keimgehalt eingestellt, der nach Kultur in CSL erreicht worden war. Mit Verdünnungsstufen dieser beiden Ausgangssuspensionen erfolgte die Kontamination, bei Staph. aureus lagen die

Gehalte zwischen  $1,8 \times 10^5/10^3$  und  $4,7 \times 10^5/10^3$  Keimen/ml, bei Klebs. pneumoniae zwischen  $5,3 \times 10^6/10^3$  und  $1,63 \times 10^7/10^4$  Keimen/ml (Angaben der höheren Werte ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ) für den Prüf-, der niedrigeren ( $10^3$ ,  $10^4$ ) für den Kontrollansatz).

Die durch diese beiden unterschiedlichen Vorkulturen gewonnenen Keimsuspensionen der beiden Spezies wurden zu gleichen Ansätzen gegenüber je einer Konzentration der 3 Desinfektionsmittel-Standards (Angabe der Konzentrationen siehe unter 4.1.2.3) geprüft.

Pro Prüfansatz wurde, wie stets, eine Kontrolle (WSH) durchgeführt.

Alle zur Nachkultur verwendeten Nährböden enthielten Inaktivierungsmittel bzw. Blut bei Jodophor-Versuchen. Durchführung und Auswertung erfolgten wie unter 4.1.2.5 und 4.1.2.6 beschrieben.

#### 4.2.3 Prüfung des Einflusses verschiedener relativer Luftfeuchte

Material, dessen Vorbereitung und die Durchführung bei diesen Versuchen sind unter 4.1.0 wiedergegeben.

In sämtlichen nachfolgend beschriebenen Versuchen, auch der Versuchsserie II, wurden die Testkeime auf CSA vor-kultiviert und aerob bei  $37^\circ\text{C}$  für 24 h bebrütet. Diese Bedingungen waren zwischenzeitlich im Sinne der weiteren Standardisierung festgelegt worden.

Die Prüfung erfolgte gegenüber je einer Konzentration der 3 Desinfektionsmittel-Standards (Angabe der Konzentrationen siehe unter 4.1.2.3), wobei die Keimträger während der Antrocknungszeit (90 min) und der Einwirkungszeiten von DIM bzw. WSH (1, 2, 3, 4 h) bei relativen Luftfeuchten von  $25 \pm 5$ , 50 und 80%, aber gleicher Temperatur ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) gelagert wurden.

Die Gehalte der Keimsuspensionen zur Kontamination der Fliesen lagen bei *Staph. aureus* zwischen  $5,3 \times 10^4/10^2$  und  $7,3 \times 10^4/10^2$  Keimen/ml, bei *Klebs. pneumoniae* zwischen  $4,3 \times 10^4/10^2$  und  $1,8 \times 10^5/10^3$  Keimen/ml (Angaben der höheren Werte ( $10^4$ ,  $10^5$ ) für den Prüf-, der niedrigeren ( $10^2$ ,  $10^3$ ) für den Kontrollansatz).

Pro Versuchsansatz erfolgte die Exposition einerseits bei Raumluftfeuchte ( $25 \pm 5\%$ ), andererseits in einem Klimaschrank mit Luftumwälzung, bei dem sich spätestens nach 10 min die gewünschte relative Feuchte einstellt. Auf diese Weise konnten jeweils 2 Bereiche, Raumluftfeuchte und 50 bzw. 80%, in Parallelansätzen unter Verwendung identischer Ausgangssuspensionen hinsichtlich ihres Effektes auf die Keimreduktion geprüft werden.

#### 4.2.4 Bestimmung von Desinfektionsmittel-Grenzkonzentrationen

Material, dessen Vorbereitung und die Durchführung der Versuche entsprechen der Beschreibung unter 4.1.0.

Die Gehalte der zur Kontamination verwendeten Keimsuspensionen waren (Angaben in Keime/ml):

*Staph. aureus* ATCC 6538

Prüfansatz : zwischen  $6 \times 10^8$  und  $1 \times 10^9$ ,  
Kontrollansatz: zwischen  $6 \times 10^2$  und  $1 \times 10^3$ .

*Klebs. pneumoniae* ATCC 4352

Prüfansatz : zwischen  $4,3 \times 10^8$  und  $1 \times 10^9$ ,  
Kontrollansatz: zwischen  $4,3 \times 10^4$  und  $1 \times 10^4$ .

*Strept. faecium*

Prüfansatz : zwischen  $1,5 \times 10^8$  und  $1,35 \times 10^9$ ,  
Kontrollansatz: zwischen  $1,5 \times 10^3$  und  $1,35 \times 10^5$ .

E. coli ATCC 11229

Diese Keimspezies erforderte wegen hoher Trocknungs-empfindlichkeit bei längerer Einwirkungszeit (4 h) eine um eine Zehnerpotenz höhere Dosis.

Prüfansatz : zwischen  $1,5 \times 10^8/10^9$  und  $1,4 \times 10^9/10^{10}$ ,  
Kontrollansatz: zwischen  $1,5 \times 10^5/10^6$  und  $1,4 \times 10^6/10^7$ .

Die 4 Keimarten wurden gegenüber je 3 Konzentrationen der 3 Desinfektionsmittel-Standards mit je einer Kontrolle pro Ansatz geprüft.

Die zur Anwendung gelangten Konzentrationen waren (Angaben in % (v/v)):

|               |                 |       |      |      |
|---------------|-----------------|-------|------|------|
| Phenol-St.    | Staph. aureus   | 0,25  | 0,5  | 1,0  |
|               | Klebs. pneum.   | 0,025 | 0,05 | 0,1  |
|               | Strept. faecium | 0,1   | 0,25 | 0,5  |
|               | E. coli         | 0,05  | 0,1  | 0,25 |
| Aldehyd-St.   | Staph. aureus   | 2,0   | 3,0  | 4,0  |
|               | Klebs. pneum.   | 0,5   | 1,0  | 1,5  |
|               | Strept. faecium | 3,0   | 4,0  |      |
|               | E. coli         | 0,5   | 1,5  | 2,0  |
| Jodophor-St.: | Staph. aureus   | 3,0   | 4,0  | 5,0  |
|               | Klebs. pneum.   | 0,05  | 0,2  | 0,25 |
|               | Strept. faecium | 0,25  | 1,0  |      |
|               | E. coli         | 0,25  | 0,5  | 1,0. |

Die Auswahl der Konzentrationen erfolgte mit dem Ziel, eine Reduktion von  $10^5$  Keimen als tatsächliche Desinfektionswirkung zu erreichen.

## 5.0 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener Inaktivierungsmethoden

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Applikationsarten der Inaktivierungsgemische sind aus den Abb. 1 bis 4 ersichtlich.

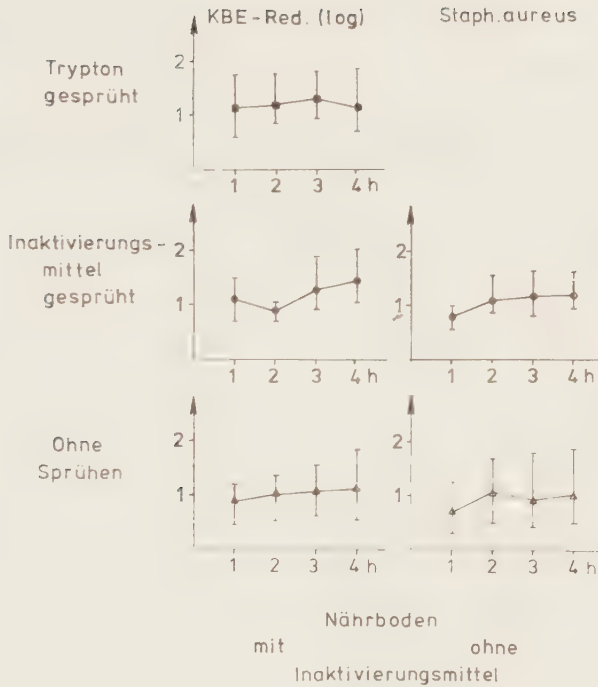


Abb. 1. "Natürliche Absterberaten" bei den 5 Methoden der Inaktivierungsmittel-Applikation.

Ohne Desinfektionsmittelbehandlung, stattdessen Wasser standardisierter Härte.

Darstellung der Mittelwerte der KBE-Reduktionen (log.) und der Streuungen der Ergebnisse aus 3 Versuchen.

Testkeim: Staph. aureus NCTC 4163, aufgebrachte Keim-

menge:  $(5 \pm 2) \times 10^2$ .  
 Lufttemperatur:  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $36 \pm 5\%$ .

Sämtliche Kurvenverläufe erweisen die Abhängigkeit der Zahl der rückgewinnbaren KBE von der Methode des Inaktivierungsmiteileinsatzes sowohl bei den Kontrollen (Abb. 1 und 2), als auch bei Verwendung des Desinfektionsmittels (Abb. 3 und 4).

Die Grafiken 1 und 2 zeigen die natürlichen Reduktionen beider Keimarten bei den 5 verschiedenen Inaktivierungsmethoden. Sie verdeutlichen, daß die Festlegung einer Rückgewinnungsart von entscheidendem Einfluß auch auf die "natürliche Absterberate" ist, welche somit ebenfalls nur einen relativen (methoden-spezifischen) Wert darstellt. Da die Keimreduktionen als Mittelwerte aus 3 Versuchen unter Verwendung dreier verschiedener Inaktivierungsgemische (Zusammensetzungen siehe unter 4.1.1.5) wiedergegeben sind, darf der Kurvenverlauf in den Abbildungen zu methoden-, jedoch nicht zu inaktivierungsmittelspezifischen Vergleichen herangezogen werden.

Die Ergebnisse der Versuche mit Staph. aureus (Abb. 1) ergaben grundsätzlich höhere "natürliche Absterberaten" bei allen Ansätzen, in denen die Keimträger mit Inaktivierungs- oder Trypton-Lösung besprüht wurden. Die KBE-Reduktionen nahmen in folgender Reihenfolge ab: zweifacher Einsatz der Inaktivierungssubstanz (Besprühen und Einarbeitung in den Nährboden), Besprühen mit Trypton-Lösung und Inaktivierung im Nährboden, gefolgt von dem Ansatz, in welchem die Keimträger mit Inaktivierungsmittel besprüht und anschließend mit Nährböden ohne Zusatz abgedruckt wurden. Die höchsten Rückgewinnungsraten erhielten wir nach Abdruck der Keimträger ohne vorherige Besprühung. Innerhalb der beiden Rückgewinnungsverfahren ohne Aufsprühen zeigte der Ansatz, bei dem das Inaktivierungsmittel in dem Nährboden enthalten war, einen regelmäßigeren Verlauf der natür-

lichen Reduktionskurven, sowie eine - bezogen auf die Zeit - einheitliche Zunahme der Streuung. Diese Methode erbrachte demnach die beste Aufhebung der Schädigung durch Trocknung.

Auch bei den Untersuchungen mit dem Testkeim Klebs. pneumoniae (Abb. 2) ergaben sich die höchsten "natürlichen Absterberaten" sowie besonders hohe und über die Zeit ungleichmäßige Streuungen in den beiden Ansätzen, bei denen Inaktivierungsmittel aufgesprüht wurde. Wiederrum erbrachte die Methode, in der die Testflächen ohne vorherige Besprühung mit inaktivierungsmittelhaltigem Nährboden abgedruckt wurden, die höchsten Rückgewinnungsraten.

Die Versuche zur optimalen Applikation von Inaktivierungsmitteln zeigten also bei den "natürlichen Absterberaten" übereinstimmend für beide Testkeime (Abb. 1 und 2), daß das Aufbringen von Lösungen auf die Keimträger einen keimzahlvermindernden Effekt hat, sowie eine größere Streuung der Werte bewirkt.

Für die Standardisierung der Prüfmethode war nicht zuletzt zu klären, ob die geringeren Rückgewinnungsraten und stärkeren Streuungen bei Besprühen der Keimträger auf den physikalischen Effekt oder auf eine Schädigung durch das Inaktivierungsmittel in Trypton-Lösung zurückzuführen sind. Letzteres ist verstärkt bei Keimen zu erwarten, welche bereits durch Trocknung vorgeschädigt sind. Ein Vergleich der Resultate der Versuche, bei welchen nur Trypton gesprüht wurde, mit denjenigen ohne Besprühen zeigte bei beiden Testkeimen (Abb. 1 und 2) ähnliche Kurvenverläufe.

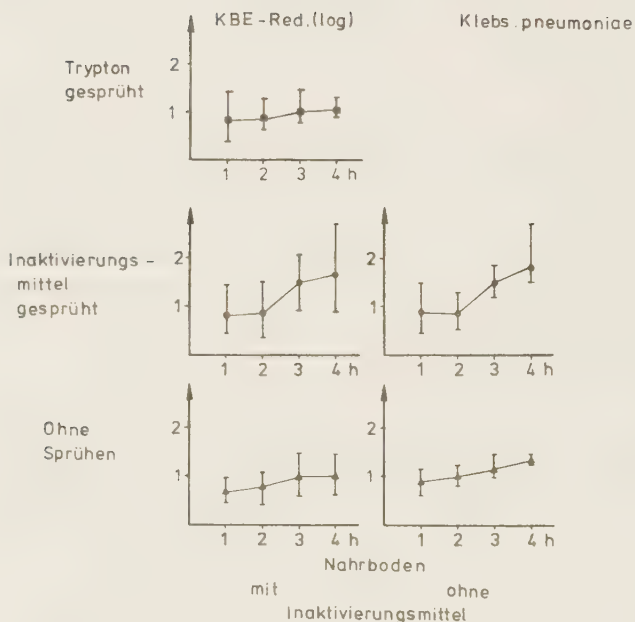


Abb. 2. "Natürliche Absterberaten" bei den 5 Methoden der Inaktivierungsmittel-Applikation.

Ohne Desinfektionsmittelbehandlung, stattdessen Wasser standardisierter Härte.  
 Darstellung der Mittelwerte der KBE-Reduktionen (log.) und der Streuungen der Ergebnisse aus 3 Versuchen.  
 Testkeim: Klebs. pneumoniae T, aufgetragene Keim-menge:  $(7 \pm 2) \times 10^2$ .  
 Lufttemperatur:  $20^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $29 \pm 3\%$ .

Starke Abweichungen, insbesondere nach längeren Einwirkungszeiten, waren aber bei den beiden Methoden, in denen Inaktivierungsmittel aufgebracht wurde, festzustellen. Offenbar wird Klebs. pneumoniae in diesem Stadium der Antrocknung stärker als Staph. aureus geschädigt. Die Versuche ergaben also, daß bei einer Applikation von Inaktivierungsmittel auf die Keimträger für die stärkere Keimreduktion vor allem die Schädigung durch das Inaktivierungsmittel verantwortlich ist. Der mechanische Einfluß des Sprühvorganges ist offenbar von untergeordneter Bedeutung.

In den Abb. 3 und 4 sind die nach der Formel (siehe unter 4.1.2.6) berechneten Reduktionsraten durch die 3 Desinfektionsmittel-Standards dargestellt. Ein Vergleich der Wirkung der Applikation von Inaktivierungssubstanzen auf den Effekt von 3 verschiedenen Desinfektionsmittel-Typen ist allerdings nur mit Einschränkung zulässig. Infolge der Auswahl "grenzwertiger" Konzentrationen (Reduktionsraten um  $10^2$ ) lassen sich aber immerhin die Einflüsse von unterschiedlichen Methoden nachweisen. (In höheren Konzentrationen dürfte jedes der 3 Präparate andere Verlaufskurven der Reduktionsraten über die Zeit bieten).

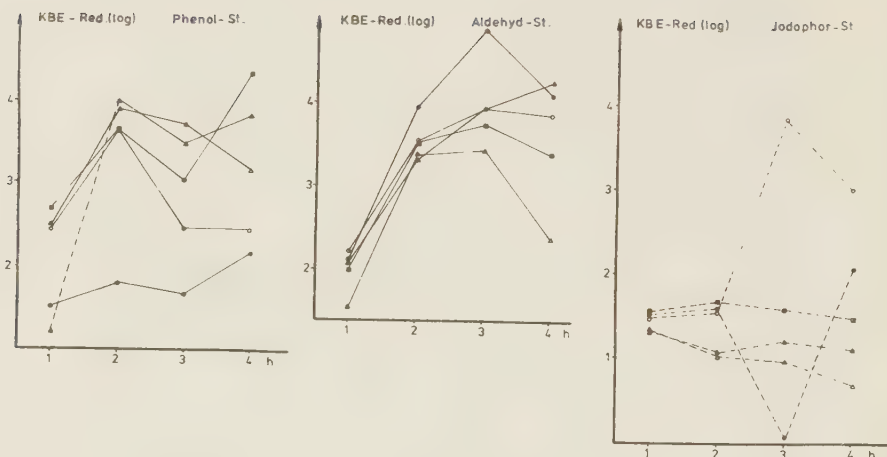


Abb. 3. Desinfektionsmittelwirkungen bei den 5 Methoden der Inaktivierungsmittel-Applikation.

Behandlung mit Phenol-, Aldehyd- und Jodophor-Standard. Darstellung der KBE-Reduktionen (log.).

Testkeim: *Staph. aureus* NCTC 4163, aufgebrauchte Keimmenge:  $(11 \pm 6) \times 10^6$ .

Lufttemperatur:  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $36 \pm 5\%$ .

Erläuterung der Symbole:

- = Berechnet aus absoluten Zahlen der insgesamt 9 Abdrucke.
- = In mindestens 1 Fall Rasenwachstum als 2000 eingesetzt.
- = Besprühen der Keimträger (Ktr.) mit Inaktivierungsmittel (Inakt.-Mittel) + Nährböden mit Inakt.-Mittel.
- = Besprühen der Ktr. mit Inakt.-Mittel + Nährböden ohne Inakt.-Mittel.
- = Besprühen der Ktr. mit Trypton-Lösung + Nährböden mit Inakt.-Mittel.
- ▲ = Ohne Besprühen der Ktr. + Nährböden mit Inakt.-Mittel.
- △ = Ohne Besprühen der Ktr. + Nährböden ohne Inakt.-Mittel.

Die Darstellung der Ergebnisse mit *Staph. aureus* nach einer Desinfektionsmittelbehandlung (Abb. 3) läßt erkennen, daß die beiden Methoden ohne vorherige Besprühung die geringsten Reduktionsraten bei weitgehend gleichmäßigem Verlauf der Kurven erbrachten. Dies zeigt sich besonders bei den Phenol- und Aldehyd-Standards, aber auch nach Einwirkung des Jodophors ist, zumindest während längerer Zeiten, die gleiche Tendenz nachzuweisen. Eine parallele Applikation von Inaktivierungsmitteln (Besprühen der Keimträger und Einsatz im Nährboden) bewirkte keine gesicherte Zunahme der Rückgewinnungsrate in den Versuchen mit den Aldehyd- und Jodophor-Standards. Die Prüfung des Phenol-Standards ergab sogar den umgekehrten Effekt, der als Wachstums- hemmung durch den zweifachen Zusatz von Inaktivierungs- substanz gedeutet werden kann. Wie bei den Kontrollen kann also auch hier die Applikation von Inaktivie- rungsflüssigkeit auf die Keimträger schädigend für die Testorganismen auswirken.

Die Kurven in Abb. 4 (*Klebs. pneumoniae*) unterscheiden sich in bezug auf Verlauf und Abstände erheblich von denen in Abb. 3. Es zeigt sich sowohl eine Keim-, als auch eine Präparatspezifität. Insbesondere nach Einwir- kung der Phenol- und Aldehyd-Standards wirkten sich methodische Einflüsse stärker aus, als dies bei *Staph. aureus* der Fall war. Nach Einwirkung des Phenol-Stan- dards ergaben sich, im Gegensatz zu den vorherigen Re- sultaten mit *Staph. aureus* als Testkeim, bei beiden Methoden, in denen Inaktivierungssubstanz aufgesprüht wurde, die geringsten Reduktionsraten. Ähnliche Man- folgen wie bei *Staph. aureus* zeigten sich dagegen nach Verwendung des Jodophor- und, mit Einschränkung, auch des Aldehyd-Standards. Ein Vergleich der 3 Kurvenbilder in Abb. 4 ergibt nach Phenol-Applikation die geringste

Reduktionsrate bei doppelter Anwendung des Enthemmers, wohingegen nach Einwirkung der beiden anderen Desinfektionsmittel-Standards bei den Ansätzen ohne jeglichen Zusatz von Inaktivierungsmittel die höchsten KBE-Werte festzustellen sind.

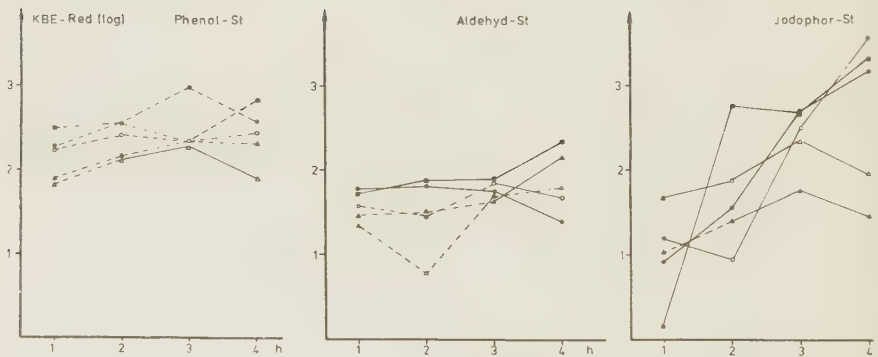


Abb. 4. Desinfektionsmittelwirkungen bei den 5 Methoden der Inaktivierungsmittel-Applikation.

Behandlung mit Phenol-, Aldehyd- und Jodophor-Standard. Darstellung der KBE-Reduktionen (log.).

Testkeim: Klebs. pneumoniae I, aufgebrauchte Keimmenge:  $(7 \pm 2) \times 10^5$ .

Lufttemperatur:  $20^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $29 \pm 3\%$ .

Erläuterung der Symbole siehe Legende Abb. 3..

Eine Gegenüberstellung von Desinfektionsmittel- und Kontrollversuchen in bezug auf entsprechende Keimzahlen bei identischer Methode und Verwendung der gleichen Inaktivierungssubstanzen läßt keine gleichartige Richtung der Befunde erkennen, d.h. hohe bzw. niedrige Desinfektionsmittel-Reduktionsraten basieren nicht auf niedrigen bzw. hohen "natürlichen Absterberaten". Da in den Kontrollen und den Desinfektionsmittel-Ansätzen keine einheitliche Tendenz innerhalb derselben Methodik nachweisbar ist, sind die Unterschiede bei verschiedenen Applikationsmethoden auf das wechselweise Zusammenwirken von Desinfektionsmittel, Inaktivierungssubstanz und Testkeim zurückzuführen.

Die in den grafischen Darstellungen zum Ausdruck kommenden Unterschiede wurden auch statistisch beurteilt. Wir wählten ein Verfahren, das es ermöglicht, durch Bestimmung der Rangplatzkorrelationen der 5 Methoden eine Bewertung vorzunehmen. Die unterschiedlichen Reduktionsraten der verschiedenen Methoden lassen bei einem Versuch pro Stundenwert eine Rangplatzverteilung von 1 bis 5 zu (Rangplatz 1 = niedrigste, Rangplatz 5 = höchste Reduktionsrate); jeder Methode wurden somit insgesamt 4 Rangplätze zugeordnet, so daß sich nach Addition eine Maßzahl als Bewertung der Methode im Vergleich zu den 4 anderen ergab. Mit Hilfe des KENDALLschen Konkordanzkoeffizienten  $W$  ließ sich sodann eine Aussage über das Maß der Homogenität der Rangplatzverteilung machen. KENDALLs  $W$  ergibt Werte zwischen 0 und 1, wobei  $W = 1$  Identität der Rangplatzverteilung bedeutet.

Nach diesem Verfahren wurden sämtliche Versuchsansätze einzeln ausgewertet. Zusätzlich ließen sich keim- und mittelspezifische Rangplatzverteilungen vornehmen, wobei für die Mittelspezifität die Summen der Reduk-

tionsraten bei den 2 Keimarten pro Mittel, für die Keimspezifität bei den "natürlichen Absterberaten" die Mittelwerte der Reduktionsraten aus 3 Versuchen, bei den Desinfektionsmittel-Ansätzen die Summen der Reduktionsraten bei den 3 Mitteln pro Keimart beurteilt wurden.

Übereinstimmend mit den grafischen Darstellungen erhielt in der Rangplatzverteilung der 5 Methoden bei den "natürlichen Absterberaten" bei beiden Keimen stets jeweils eine der Methoden ohne vorherige Besprühung den niedrigsten Rangplatz. Dieses war bei der Beurteilung der Mittelwerte aus 3 Versuchen für *Staph. aureus* (Konkordanzkoeffizient  $W = 0,459$ ) der Ansatz ohne jegliche Verwendung von Inaktivierungsmittel, bei *Klebs. pneumoniae* ( $W = 0,803$ ) derjenige mit alleinigem Zusatz zum Nährboden ohne Besprühung der Keimträger. Die mittelspezifische Rangplatzverteilung bei den "natürlichen Absterberaten" zeigte, daß bei Phenol ( $W = 0,438$ ) und Aldehyd ( $W = 0,683$ ) die Methode ohne Besprühung (unter Verwendung von Inaktivierungsmittel im Nährboden) die günstigsten Resultate ergibt. Nach Jodophoranwendung ( $W = 0,547$ ) ist die Rückgewinnung ohne jegliche Verwendung von Inaktivierungsmittel vorzuziehen.

Die Rangplatzverteilungen der 5 Methoden bei den "natürlichen Absterberaten" im Hinblick auf Keim- und Mittelspezifität sind der Tab. 1 zu entnehmen. Die Werte wurden ermittelt durch Rangreihung der Summen der 4 Stundenwert-Rangplätze pro Ansatz, so daß sich jede der 5 Methoden durch 1 Rangplatz darstellen ließ. Ebenso sind die zugehörigen KENDALLschen Konkordanzkoeffizienten ( $W$ ) angegeben.

Tab. 1. Rangplatzverteilungen der 5 Methoden bei den "natürlichen Absterberaten" und ihre Konkordanzkoeffizienten (W).

|     | Besprühung<br>mit<br>Inakt.-Mittel,<br>Nährböden | Besprühung<br>mit<br>Inakt.-Mittel,<br>Nährböden | Besprühung<br>mit<br>Tynton-Isr.,<br>Nährböden | Ohne<br>Besprühung,<br>Nährböden<br>mit<br>Inakt.-Mittel | Ohne<br>Besprühung,<br>Nährböden<br>ohne<br>Inakt.-Mittel |
|-----|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 4   |                                                  | 3                                                | 5                                              | 2                                                        | 1                                                         |
| 3   |                                                  | 5                                                | 2                                              | 1                                                        | 4                                                         |
| 4   |                                                  | 2                                                | 3                                              | 1                                                        | 5                                                         |
| 3,5 |                                                  | 5                                                | 2                                              | 1                                                        | 3,5                                                       |
| 5   |                                                  | 3                                                | 4                                              | 2                                                        | 1                                                         |

1a) Keimspezifisch

Staph. aureus

W = 0,4594

Klebs. pneumoniae

W = 0,803125

1b) Mittelspezifisch

Phenol-St.

W = 0,4375

Aldehyd-St.

W = 0,6833

Jodophor-St.

W = 0,546875

Die Bewertung der Methoden auf Grund von Rangplatzverteilungen innerhalb der Desinfektionsmittel-Versuche läßt im Vergleich zu denjenigen bei den Kontrollen zwar die gleiche Tendenz aufzeigen, jedoch in nicht ganz so einheitlicher Form, was auf das hier komplexere Wechselgeschehen zwischen Testkeim, Desinfektionsmittel und Inaktivierungssubstanz zurückzuführen ist. In der überwiegenden Zahl lassen sich jedoch auch hier mit einem der beiden Ansätze ohne Besprühung die günstigsten Resultate erzielen.

Dieses galt keimspezifisch für *Staph. aureus* ( $W = 0,484375$ ) und mittelspezifisch für den Aldehyd-Standard ( $W = 0,6125$ ). In beiden Fällen erzielten die Ansätze ohne jeglichen Enthemmer-Zusatz die günstigsten Resultate. Nach Jodophoranwendung ( $W = 0,3375$ ) erhielten wir die niedrigsten Reduktionsraten bei Versuchen mit Inaktivierungssubstanz im Nährboden ohne Besprühung der Keimträger. In Abweichung von den Ergebnissen der Kontrollen ergaben sich mittelspezifisch für Phenol ( $W = 0,559375$ ) und keimspezifisch für *Klebs. pneumoniae* ( $W = 0,659375$ ) niedrigere Reduktionsraten bei Ansätzen mit Besprühung von Inaktivierungsmittel.

Der Tab. 2 sind die Rangplatzverteilungen der 5 Methoden bei den Desinfektionsmittel-Versuchen und ihre KENDALLschen Konkordanzkoeffizienten ( $W$ ) bei keim- und mittelspezifischer Beurteilung zu entnehmen.

Tab. 2. Rangplatzverteilungen der 5 Methoden bei den Desinfektionsmittel-Versuchen und ihre Konkordanzkoeffizienten (W).

| Besprühung<br>mit<br>Inakt.-Mittel,<br>Nährböden | Besprühung<br>mit<br>Inakt.-Mittel,<br>Nährböden | Besprühung<br>mit<br>Trypten-Lsg.,<br>Nährböden | Ohne<br>Besprühung,<br>Nährböden<br>mit<br>Inakt.-Mittel | Ohne<br>Besprühung,<br>Nährböden<br>ohne<br>Inakt.-Mittel |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|

## 2a) Keimspezifisch

Staph. aureus  
W = 0,484375

Klebs. pneumoniae  
W = 0,659375

## 2b) Mittelspezifisch

Phenol-St.  
W = 0,559375

Aldehyd-St.  
W = 0,6125

Jodophor-St.  
W = 0,3375

Nach Bestimmung der Rangplatzkorrelationen der Reduktionsraten selbst wurden als weitere Form der Auswertung die Unterschiede der Reduktionsraten auf ihre Abhängigkeit von der angewandten Methode untersucht. Pro Stundenwert wurde die Differenz von der Reduktionsrate bei jeder der 5 Methoden und derjenigen bei jeder der 4 anderen gebildet, diese Differenzen pro Stundenwert gerangreicht und wie oben beschrieben verrechnet.

Durchweg ließ sich zeigen, daß die größten Unterschiede bei den Variablen Besprühen bzw. Nicht-Besprühen bestanden, die Variable des unterschiedlichen Nährbodens (mit oder ohne Inaktivierungsmittel) spielte eine weniger große Rolle.

Tab. 3 gibt die KENDALLschen Konkordanzkoeffizienten (W) der Rangplatzkorrelationen der Differenzen der Reduktionsraten wieder.

Tab. 3. Konkordanzkoeffizienten (KENDALLs W) der Rangplatzverteilungen der Unterschiede der 5 Methoden bei den "natürlichen Absterberaten" und bei den Desinfektionsmittel-Versuchen.

3a) "Natürliche Absterberaten"

|                   | Phenol-St. | Aldehyd-St. | Jodophor-St. |
|-------------------|------------|-------------|--------------|
| Staph. aureus     | 0,4435606  | 0,355303    | 0,6878787    |
| Klebs. pneumoniae | 0,188428   | 0,6696969   | 0,4183712    |

3b) Desinfektionsmittel-Versuche

|                   | Phenol-St. | Aldehyd-St. | Jodophor-St. |
|-------------------|------------|-------------|--------------|
| Staph. aureus     | 0,4837121  | 0,3613636   | 0,238484     |
| Klebs. pneumoniae | 0,424242   | 0,2670454   | 0,3640151    |

## 5.2 Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener Vorkulturmedien

In den Abb. 5 und 6 sind die unterschiedlichen Reduktionen in Abhängigkeit von der Art der Vorkultur (CSL oder CSA) dargestellt.

Die "natürlichen Absterberaten" bei beiden Keimarten sind der Abb. 5 zu entnehmen.

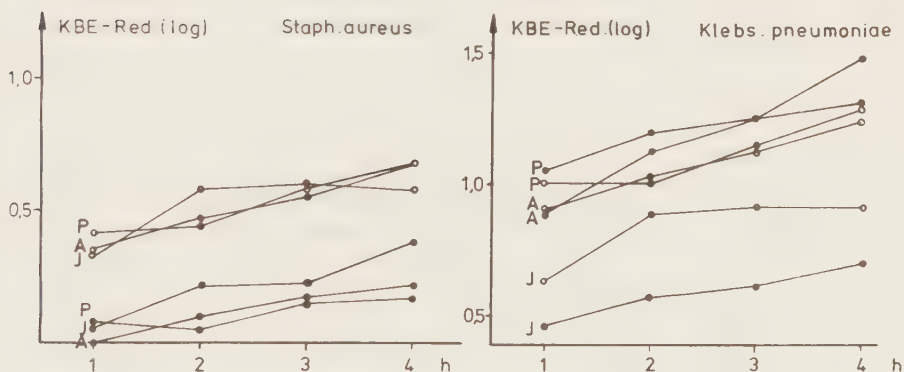


Abb. 5. "Natürliche Absterberaten" nach Kultur der  
Testkeime auf CSA (●) und in CSL (○).

Ohne Desinfektionsmittelbehandlung, stattdessen Wasser standardisierter Härte, bei Verwendung von 3 verschiedenen Rückkulturnährböden (P = mit Phenol-Inakt.-Mittel, A = mit Aldehyd-Inakt.-Mittel, J = Blutagar).

Darstellung der KBE-Reduktionen (log.).

Testkeime: Staph. aureus NCTC 4163, aufgebrachte Keim-  
menge:  $(3 \pm 1) \times 10^2$ ; Klebs. pneumoniae I, aufgebrachte  
Keimmenge:  $(8 \pm 3) \times 10^2$ .

Lufttemperatur:  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $37 \pm 2\%$ .

Bei *Staph. aureus* ergaben sich durchweg nach Kultur in CSL um ca. 0,2 bis 0,3 Zehnerpotenzen höhere Reduktionsraten. Diese Unterschiede sind über alle Testzeiten und bei allen 3 Versuchen unter Verwendung verschiedener Inaktivierungsmittel im Nährboden in gleichem Maße festzustellen. Es handelt sich um eine keimspezifische, trocknungsunabhängige Resistenzminderung.

Eine solche einheitliche Tendenz läßt sich bei *Klebs. pneumoniae* allerdings nicht erkennen. Bei Rückgewinnung der Keime mit Blutagar ("Jodophor-Inaktivierungsmittel") zeigten sich zwar ebenfalls um 0,2 bis 0,3 Zehnerpotenzen höhere Reduktionsraten bei CSL, weit geringere Unterschiede ergaben sich jedoch bei Verwendung von Nährböden mit den beiden übrigen Enthemmer-Substanzen. Die Tendenz höherer Absterberaten nach Kultur in CSL über den gesamten Zeitlauf gesehen läßt sich aber auch bei diesem Testkeim ablesen. Wie bei den unter 5.1 abgehandelten Ergebnissen läßt sich bei *Klebs. pneumoniae* wieder eine Keim- und Mittelspezifität nachweisen.

Die aus denselben Versuchsansätzen berechneten Reduktionsraten durch die 3 Desinfektionsmittel-Standards (Abb. 6) bestätigen die Abhängigkeit von der Art der Vorkultur. So sind nach Einwirkung des Phenol-Standards geringere Rückgewinnungsraten mit Vorkultur in CSL zu erkennen (bei *Staph. aureus* bestehen Unterschiede um fast 2, bei *Klebs. pneumoniae* von 0,4 bis 1,6 Zehnerpotenzen). Nach Einwirkung des Aldehyd-Standards zeigen sich dagegen nur unwesentliche Differenzen.

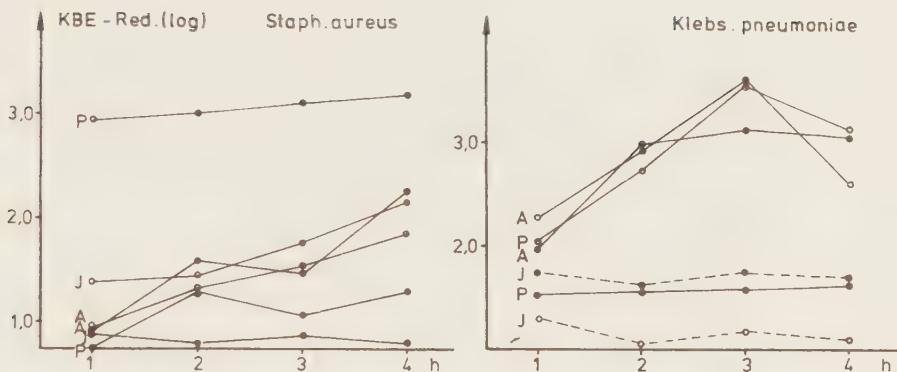


Abb. 6. Desinfektionsmittelwirkungen nach Kultur der Testkeime auf CSA (●) und in CSL (○).

Behandlung mit Phenol- (P), Aldehyd- (A) und Jodophor-Standard (J).

Darstellung der KBE-Reduktionen (log.).

Testkeime: Staph. aureus NCTC 4163, aufgebrachte Keimmenge:  $(3 \pm 1) \times 10^4$ ; Klebs. pneumoniae I, aufgebrachte Keimmenge:  $(8 \pm 3) \times 10^5$ .

Lufttemperatur:  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $37 \pm 2\%$ .

Insgesamt besaßen die Keime nach Vorkultur auf CSA eine höhere Resistenz als nach Bebrütung in CSL.

Das Ausmaß der Resistenzunterschiede hängt dabei als Ausdruck spezifischer Wechselwirkungen auch von den Inaktivierungsmittelzusätzen in den Nährböden ab, welche zur Rückgewinnung verwendet werden.

### 5.3 Ergebnisse der Prüfung des Einflusses verschiedener relativer Luftfeuchte

Die "natürlichen Absterberaten" sowie die Reduktionsraten durch die 3 Desinfektionsmittel-Standards nach Exposition bei verschiedenen relativen Luftfeuchten ( $25 \pm 5$ , 50 bzw. 80%) sind in den Abb. 7 und 8 als relative Differenzen zur Reduktionsrate bei 25% (Abszisse) wiedergegeben. Infolge der versuchsbedingten geringen Abweichungen der Koloniezahlen in den einzelnen Ansätzen veranschaulicht diese Form der Darstellung die Unterschiede der Reduktionsraten nach Exposition bei jeweils 2 Feuchtigkeitsbereichen am besten.

Die Daten in der Abb. 7 (Kontrollen) stammen von Tests, in denen verschiedene Inaktivierungssubstanzen den Nährböden der "Rodac"-Platten zugesetzt waren. Die Rückgewinnungsraten von Staph. aureus und Klebs. pneumoniae wurden demnach durch die relative Feuchte stark verändert. Darüberhinaus zeigte sich auch hier wieder eine Beeinflussung der "natürlichen Absterberaten" durch die Zusammensetzung des Rückkulturmediums.

Die Verwendung des "Phenol-Inaktivierungsmittels" ergab zu allen Zeiten eine höhere "natürliche Absterberate" von Staph. aureus nach Exposition bei  $25 \pm 5$  als bei 50% r.F.. Diese Unterschiede verminderten sich mit zunehmender "Einwirkungszeit" (0,5 Zehnerpotenzen beim 1 h-, 0,3 beim 4 h-Wert). Auffällig ist jedoch, daß die Erhöhung auf 80% keine vermehrte Rückgewinnung ergibt, vielmehr zeigte sich nach 1- und 4-stündiger "Einwirkungszeit" eine geringgradig verstärkte Reduktion, aber ebenfalls um 0,3 Zehnerpotenzen niedrigere Absterberaten beim 2 h- und 3 h-Wert. Der Nachweis derselben Testkeime mit dem "Aldehyd-Inaktivierungsmittel"

im Rückkulturnährboden führte zu völlig anderen Ergebnissen. Nunmehr wurden nach Lagerung bei 25 und 80% r.F. die höchsten KBE-Werte beobachtet. Die Exposition bei 50% r.F. erbrachte um 0,16 bis 0,7 (4 h-Wert) Zehnerpotenzen höhere Reduktionsraten. Die Anwendung eines Blut-CSA-Gemisches ("Jodophor-Inaktivierungsmittel") ergab die beste Rückgewinnung nach Exposition bei 50% r.F.. Die Werte nach Lagerung bei 25 und 80% r.F. differierten hier nur gering.

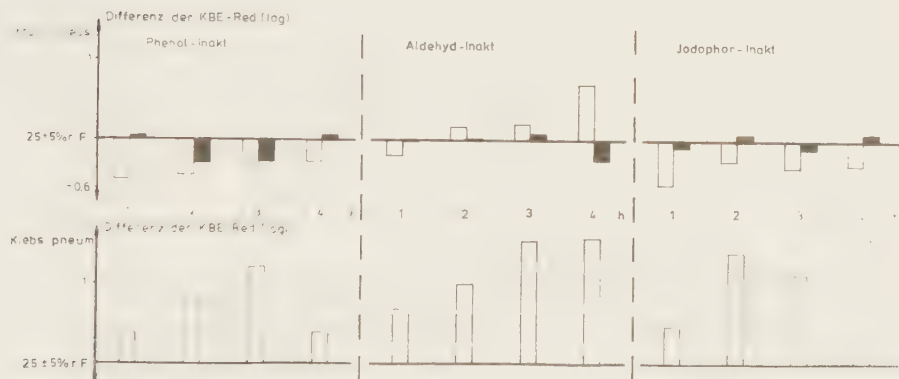


Abb. 7. Differenzen "natürlicher Absterberaten" bei 25 ± 5, 50 und 80% r.F..

Ohne Desinfektionsmittelbehandlung, stattdessen Wasser standardisierter Härte, bei Verwendung von 3 verschiedenen Rückkulturnährböden.

Vergleich von 25 ± 5 mit 50% r.F. (□) bzw. 25 ± 5 mit 80% r.F. (■).

Darstellung der Differenzen der KBE-Reduktionen (log.).

Testkeime: Staph. aureus NCTC 4163, aufgebrauchte Keimmenge:  $(6 \pm 1) \times 10^1$ ; Klebs. pneumoniae I, aufgebrauchte

Keimmenge:  $(8 \pm 4) \times 10^1$ .

Lufttemperatur:  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

In den Darstellungen der Ergebnisse mit Klebs. pneumoniae mußte auf die Verwertung der Daten bei 80% r.F. verzichtet werden, da in allen Fällen auf den "Rodac"-Platten der Kontrollversuche keine Keime nachweisbar waren. Die "natürlichen Absterberaten" lagen also bei einer r.F. von 80% in allen Versuchen besonders hoch (>2 Zehnerpotenzen). Zum Unterschied von den Staph. aureus-Werten verursachte die Exposition bei 50% r.F. stets höhere Reduktionsraten gegenüber denen bei 25%, jedoch war auch hier der Einfluß der Zusammensetzung des Rückgewinnungsmediums erkennbar.

Die Abb. 7 läßt unterschiedliche Auswirkungen der relativen Luftfeuchte auf die "natürliche Absterberate" erkennen. Sie sind von der Art des Testkeimes, der Zusammensetzung des Rückgewinnungsmediums, aber auch von der Expositionszeit, also von der Art bzw. dem Stadium der Schädigung der Testkeime abhängig. Weniger einheitlich wirken diese Einflüsse bei Staph. aureus, wohingegen bei Klebs. pneumoniae eine Erhöhung der r.F. von 25 auf 50 bzw. 80% einheitlich zu einer Zunahme der Absterberaten führte.

Unterschiedliche relative Feuchte beeinflusst die Desinfektionsmittelwirkung (Abb. 8) anders als das "natürliche Absterben". Staph. aureus zeigte nach Phenol-Einwirkung eindeutig bei 50% die höchsten Reduktionsraten, bei 80% dagegen etwas geringere. Ebenso erbrachte die Prüfung mit dem Jodophor-Standard in den höheren Feuchtigkeitsbereichen stärkere Reduktionen, wobei die Exposition bei 80% die geringsten KBE-Werte erzielte. Die Testung bei 25% r.F. bedeutet somit eine Verschärfung der Prüfbedingungen für Phenole und Jodophore. Mit dem Aldehyd-Standard war nach 1 h Exposition bei 80% r.F. die geringste Desinfektionsmittelwirkung festzustellen, während sie nach 4 h bei 50% auftrat.

Ein Vergleich der Veränderungen der Differenzen über die Zeit zeigt bei den 3 Mitteln eine Tendenz der Zunahme der Unterschiede bis zum 2 h- oder 3 h-Wert und anschließender Abnahme.

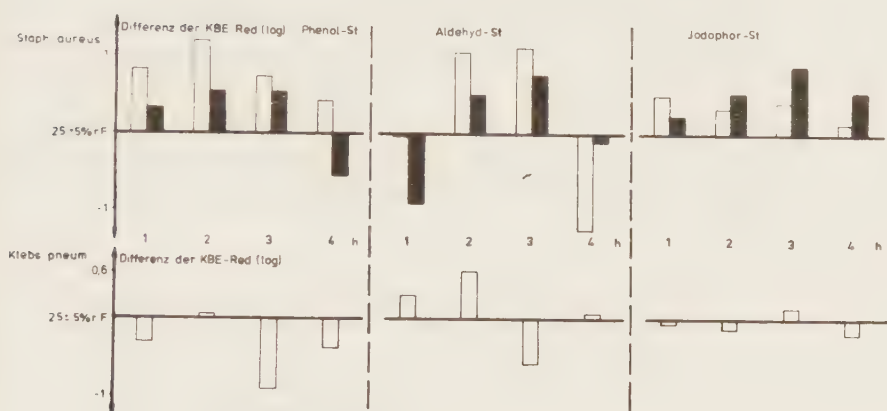


Abb. 8. Differenzen der Desinfektionsmittelwirkungen bei 25 ± 5, 50 und 80% r.F..

Behandlung mit Phenol-, Aldehyd- und Jodophor-Standard. Vergleich von 25 ± 5 mit 50% r.F. (□) bzw. 25 ± 5 mit 80% r.F. (■).

Darstellung der Differenzen der KBE-Reduktionen (log.). Testkeime: *Staph. aureus* NCTC 4163, aufgebrachte Keimmenge:  $(6 \pm 1) \times 10^3$ ; *Klebs. pneumoniae* I, aufgebrachte Keimmenge:  $(8 \pm 4) \times 10^3$ . Lufttemperatur:  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Anders wurde die Wirksamkeit der 3 Desinfektionsmittel-Standards gegenüber *Klebs. pneumoniae* durch unterschiedliche relative Feuchte beeinflusst. Der Phenol-Standard war gegen diesen Testkeim bei 50% r.F. geringer wirksam als bei 25%. Der Aldehyd-Standard erbrachte

ebenso wie gegenüber Staph. aureus wechselnde Ergebnisse mit der Tendenz zu höheren Reduktionen bei 50%. Keinen wesentlichen Einfluß ließ der Wechsel von 25 auf 50% r.F. während Einwirkung des Jodophor-Standards auf Klebs. pneumoniae erkennen.

Es besteht demnach eine deutliche Abhängigkeit der Desinfektionsmittelwirkung von der relativen Luftfeuchte. Sie ist sowohl durch eine Keim-, als auch eine Präparatspezifität charakterisiert. Wichtig ist dabei, daß der Verlauf der Reduktionsraten in ihrer Wechselbeziehung mit der relativen Feuchte nicht mit dem Verlauf der "natürlichen Absterberaten" in Einklang steht.

#### 5.4 Ergebnisse der Bestimmung von Desinfektionsmittel-Grenzkonzentrationen

In den Abb. 9 bis 11 sind die Reduktionsraten der 4 Testkeimarten nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen der 3 Desinfektionsmittel-Standards dargestellt.

Die Abb. 9 zeigt die Wirkungen des Phenol-Standards auf die verschiedenen Testkeime, welche starke Empfindlichkeitsunterschiede aufwiesen. Während bei Staph. aureus eine Konzentration von 0,5% notwendig war, um nach 2 h eine Reduktion um  $10^5$  Keime zu erzielen, waren bei Strept. faecium dafür nur 0,1% erforderlich. Die gleiche Konzentration bewirkte bei E. coli erst nach 3 h, bei Klebs. pneumoniae bereits nach 90 min eine  $10^5$ -Reduktion. Klebsiella erwies sich somit als am empfindlichsten.

# PHENOL

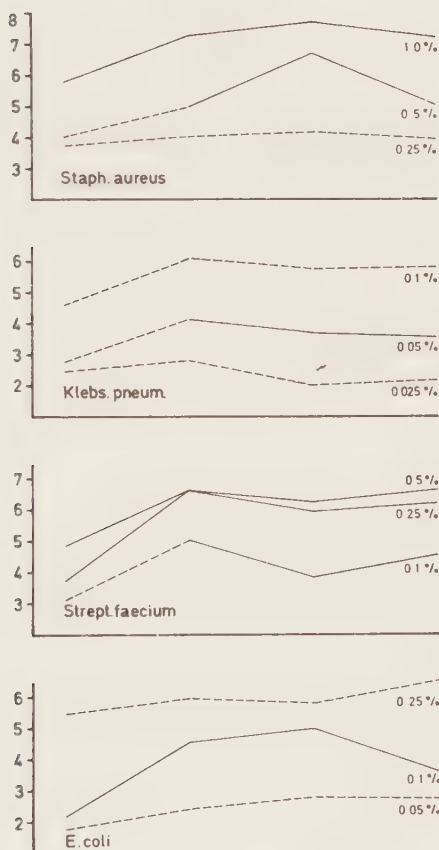


Abb. 9. KBE-Reduktionen (log.) nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen des Phenol-Standards.

Testkeime:

Staph. aureus ATCC 6538, aufgebrachte Keimmenge  $6,5 \times 10^7$  (Kontrollen  $6,5 \times 10^7$ ); Klebs. pneumoniae ATCC 4352, aufgebrachte Keimmenge  $5,7 \times 10^7$  (Kontrollen  $5,7 \times 10^3$ ); Strept. faecium, aufgebrachte Keimmenge  $1,3 \times 10^7$  (Kontrollen  $1,3 \times 10^3$ ); E. coli ATCC 11229, aufgebrachte Keimmenge  $1,2 \times 10^8$  (bei 1, 2, 3 h)/ $10^9$  (bei 4 h) (Kontrollen  $1,2 \times 10^4$  (bei 1, 2, 3 h)/ $10^5$  (bei 4 h)).  
Lufttemperatur:  $21,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $34 \pm 4\%$ .

Erläuterung der Symbole:

———— = Berechnet aus absoluten Zahlen der insgesamt 9 Abdrucke.  
----- = In mindestens 1 Fall Rasenwachstum als 2000 eingesetzt.

# ALDEHYD

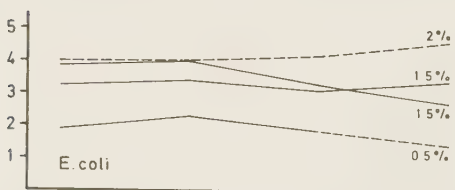
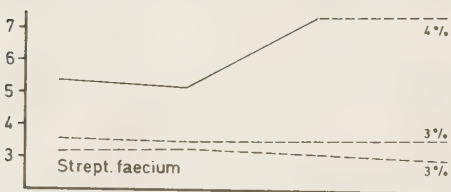
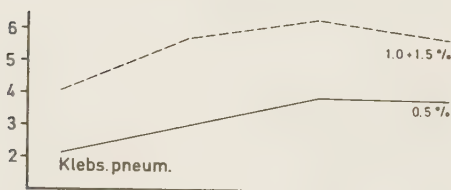
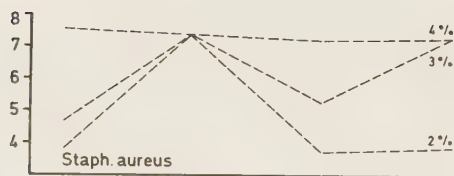


Abb. 10. KBE-Reduktionen (log.) nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen des Aldehyd-Standards.

Testkeime:

*Staph. aureus* ATCC 6538, aufgebraute Keimmenge  $1 \times 10^8$  (Kontrollen  $1 \times 10^2$ ); *Klebs. pneumoniae* ATCC 4352, aufgebraute Keimmenge  $1 \times 10^8$  (Kontrollen  $1 \times 10^3$ ); *Strept. faecium*, aufgebraute Keimmenge  $(1,9 \pm 0,4) \times 10^7$  (Kontrollen  $(2,4 \pm 0,9) \times 10^3$ ); *E. coli* ATCC 11229, aufgebraute Keimmenge  $1,5 \times 10^7$  (bei 1, 2, 3 h)/ $10^8$  (bei 4 h) (Kontrollen  $1,5 \times 10^4$  (bei 1, 2, 3 h)/ $10^5$  (bei 4 h)); Lufttemperatur:  $23,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $30 \pm 2\%$ .

Erläuterung der Symbole siehe Legende Abb. 9..

Der Abb. 10 sind die Ergebnisse nach Einwirkung des Aldehyd-Standards zu entnehmen. Bei allen Keimarten waren höhere Konzentrationen als bei Prüfung mit dem Phenol-Präparat erforderlich. Klebs. pneumoniae zeigte auch hier die höchste Empfindlichkeit und verlangte eine Konzentration von 1,0% zur  $10^5$ -Reduktion im Zeitraum von 90 min. Bei Staph. aureus zeigte sich dieser Effekt erst bei 2,0%. Die beiden übrigen Keimarten erforderten noch höhere Konzentrationen. Bei E. coli reichte eine Konzentration von 2,0% nicht aus, um nach 4 h die gewünschte Reduktion herbeizuführen, während bei Strept. faecium die 4%ige Konzentration nach 1 h die verlangte Wirkung erzielte.

Die Ergebnisse der Prüfung mit dem Jodophor-Standard sind in der Abb. 11 dargestellt. Klebs. pneumoniae, welcher mit 0,05 bis 0,25% getestet wurde, konnte mit keiner dieser Konzentrationen ausreichend reduziert werden. Keine der gewählten Konzentrationen von 0,25 bis 1,0% konnte ferner bei Strept. faecium und E. coli eine  $10^5$ -Reduktion innerhalb von 4 h bewirken. Staph. aureus erwies sich, wie gegenüber dem Phenol-Standard, auch hier als relativ resistent, denn erst nach Einwirkung einer 5%igen Konzentration ließ sich nach 1 h eine Keimzahlreduktion von  $10^5$  erreichen.

Klebs. pneumoniae zeigte sich bei allen 3 Desinfektionsmittel-Standards als am empfindlichsten, Staph. aureus bei 2 der 3 Präparate als am resistentesten, während die beiden übrigen Keimarten im Vergleich zu den 2 anderen stets in den mittleren Empfindlichkeitsbereich einzuordnen sind. Lediglich gegenüber dem Aldehyd-Standard besaß Strept. faecium die höchste Resistenz.

Die Tab. 4 gibt die beiden Konzentrationen der 3 Desinfektionsmittel-Standards, die bei den 4 Testkeimen nach kurzer (1 - 1 1/2 h) und langer Einwirkungszeit (4 h) eine Keimzahlreduktion um  $10^5$  bewirkten.

# JODOPHOR

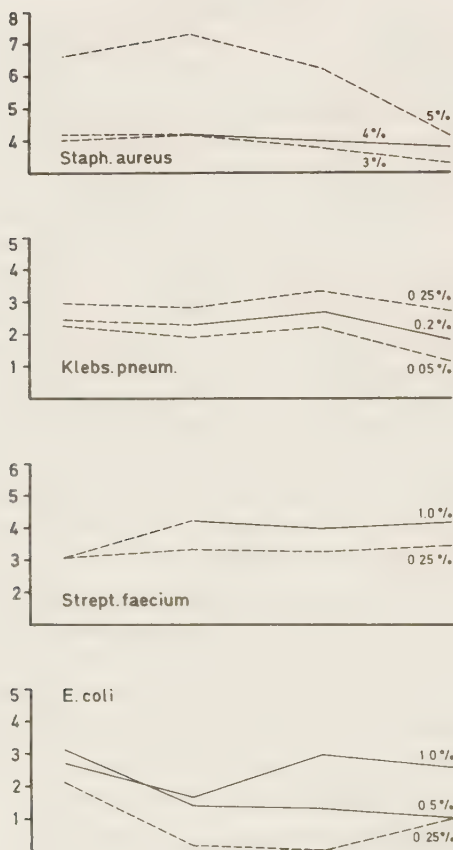


Abb. 11. KBE-Reduktionen (log.) nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen des Jodophor-Standards.

Testkeime:

Staph. aureus ATCC 6538, aufgebrachte Keimmenge  $1 \times 10^8$  (Kontrollen  $1 \times 10^2$ ); Klebs. pneumoniae ATCC 4352, aufgebrachte Keimmenge  $(5,5 \pm 1,3) \times 10^7$  (Kontrollen  $(5,5 \pm 1,3) \times 10^5$ ); Strept. faecium, aufgebrachte Keimmenge  $5,9 \times 10^8$  (Kontrollen  $5,9 \times 10^3$ ); E. coli ATCC 11229, aufgebrachte Keimmenge  $1,4 \times 10^8$  (bei 1, 2, 3 h)/ $10^9$  (bei 4 h) (Kontrollen  $1,4 \times 10^5$  (bei 1, 2, 3 h)/ $10^6$  (bei 4 h)); Lufttemperatur:  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchte:  $33 \pm 1\%$ .

Erläuterung der Symbole siehe Legende Abb. 9..

Tab. 4. Keimreduktion von  $10^5$  nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen der 3 Desinfektionsmittel-standards.

|                               | Phenol-St.                                                |                                                                                     |                                                           | Aldehyd-St.                                                                         |                                                           |                                                                                     | Jodophor-St.                                              |                                                                                     |        |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|                               | Konzentration<br>(% v/v) des<br>Desinfektions-<br>mittels | Zeitraum (h),<br>in welchem<br>eine<br>Keimreduktion<br>von $10^5$<br>erreicht wird | Konzentration<br>(% v/v) des<br>Desinfektions-<br>mittels | Zeitraum (h),<br>in welchem<br>eine<br>Keimreduktion<br>von $10^5$<br>erreicht wird | Konzentration<br>(% v/v) des<br>Desinfektions-<br>mittels | Zeitraum (h),<br>in welchem<br>eine<br>Keimreduktion<br>von $10^5$<br>erreicht wird | Konzentration<br>(% v/v) des<br>Desinfektions-<br>mittels | Zeitraum (h),<br>in welchem<br>eine<br>Keimreduktion<br>von $10^5$<br>erreicht wird |        |
| Staph.<br>aureus<br>ATCC 6538 | 1,0<br>0,5                                                | 1<br>2 - 4                                                                          | 2,0<br>2,0                                                | 1 1/2<br>2 - 4                                                                      | 5,0<br>5,0                                                | 1<br>2 - 4                                                                          | 5,0<br>5,0                                                | 1<br>2 - 4                                                                          | 1<br>4 |
| Klebs.<br>pneum.<br>ATCC 4352 | 0,1<br>0,1                                                | 1 1/2<br>2 - 4                                                                      | 1,0<br>1,0                                                | 1 1/2<br>2 - 4                                                                      | >0,25<br>>0,25                                            | 1<br>4                                                                              | >0,25<br>>0,25                                            | 1<br>4                                                                              | 1<br>4 |
| Strept.<br>faecium            | 0,5<br>0,1                                                | 1 1/2<br>2 - 4                                                                      | 4,0<br>4,0                                                | 1<br>2 - 4                                                                          | >1,0<br>>1,0                                              | 1<br>4                                                                              | >1,0<br>>1,0                                              | 1<br>4                                                                              | 1<br>4 |
| E. coli<br>ATCC 11229         | 0,25<br>0,1                                               | 1<br>3 - 4                                                                          | >2,0<br>>2,0                                              | 1<br>4                                                                              | >1,0<br>>1,0                                              | 1<br>4                                                                              | >1,0<br>>1,0                                              | 1<br>4                                                                              | 1<br>4 |

## 6.0 Diskussion

Das entscheidende Problem jeglicher Methode zur Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen ist die Rückgewinnbarkeit der Testkeime, welche durch zahlreiche Variable beeinflusst wird. Die optimale Standardisierung einer solchen Prüfmethode erfordert daher die Bestimmung dieser Einflußfaktoren in umfangreichen Untersuchungen.

Einige Variable, welche die Rückgewinnbarkeit der Testkeime beeinflussen, wie das Material des Keimträgers, das Suspensionsmedium der Testkeime, die Verdünnungsflüssigkeit des Desinfektionsmittels und die Art der Rückkultur, wurden bereits beurteilt (4, 19, 33, 35). Nunmehr galt es, den Einfluß weiterer Faktoren zu überprüfen, welche die Absterberate, sowohl bei den Kontrollen, als auch bei der Desinfektionsmitteleinwirkung, verändern. Da das vorgesehene Testverfahren zur Berechnung der tatsächlichen Desinfektionswirkung (gesamte Keimzahlreduktion minus "natürlicher Absterberate") dient, kann auch eine Beeinträchtigung der "natürlichen Absterberate" das Resultat verfälschen. Vor allem ist an eine Schädigung der Testkeime durch das Inaktivierungsmittel, sowie an eine Resistenzänderung der Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Vorkultur und der relativen Luftfeuchte zu denken.

Verschiedene Autoren geben für die Art der Applikation des Inaktivierungsmittels unterschiedliche Empfehlungen. In den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM, 5), nach welchen die Desinfektionsmittelwirkung durch Abreiben der Keimträger mit Wattetupfern und deren anschließendem Ausstreichen auf Nährböden geprüft wird, erfolgt die

Inaktivierung durch Befeuchten des Tupfers mit "Enthemmungsmittel" in Nährbouillon. Für die Nährböden ist kein Inaktivierungsmittel vorgeschrieben. In dem von MOSSEL und HARREWIJN (18) zur Rückgewinnung der Testkeime vorgeschlagenen Abspülverfahren werden die Keimträger in einer Inaktivierungslösung (ohne Bouillon) mit nachfolgender Subkultur auf Nährböden geschüttelt. In einer Abdruckmethode wird von REYBROUCK (21) ebenfalls die Behandlung der Testflächen mit Inaktivierungsmittel empfohlen.

Bei Abdruckverfahren bestehen prinzipiell 2 Möglichkeiten der Applikation des Inaktivierungsmittels, nämlich die Behandlung der Keime auf den Trägern oder die Einarbeitung in den Rückgewinnungsagar bzw. die Kombination beider Verfahren. Nur eine solche Applikationsmethode kann empfohlen werden, welche weitgehend standardisierte Durchführung gestattet und die Testkeime nicht derart schädigt, daß die Koloniebildung auf dem Nährboden unterdrückt wird. Selbstverständlich muß bei allen Keimträgern, welche zur Kontrolle bzw. zur Prüfung der Desinfektionswirkung dienen, dasselbe Vorgehen angewandt werden.

Vor der Diskussion der Ergebnisse ist zu betonen, daß diese Untersuchungen nur eine Aussage über die verschiedenen Methoden der Applikation der Inaktivierungsmittel und nicht über die Eignung der Zusätze selbst gestatten. Die Resultate dieser Experimente lassen eindeutig erkennen, daß der mechanische Effekt durch das Ansprühen der Keimträger nur untergeordnete Bedeutung für die Rückgewinnungsrate hat. Die Applikation von Inaktivierungsmittel auf die Keimträger bedeutet eine zusätzlich starke Noxe für die durch Trocknung oder Desinfektionsmitteleinwirkung geschädigten Mikroorganismen. Die dadurch bedingte verminderte Rückgewinnung

ist offenbar abhängig von dem Anteil an Testkeimen, welcher reversibel geschädigt vorliegt. Daher nimmt dieser Effekt mit der Trocknungszeit zu. Auch die tatsächliche Desinfektionsmittelwirkung wird durch solch ein Vorgehen "verstärkt". Allerdings werden durch Trocknung oder Desinfektionsmitteleinwirkung vorgeschädigte Keime durch das Inaktivierungsmittel nicht im gleichen Ausmaß beeinträchtigt.

In Betracht zu ziehen ist die Entstehung von Verbindungen zwischen Desinfektions- und Inaktivierungsmittel, welche die Keime auf andere Weise schädigen als die Komponenten alleine. Entsprechend verschieden sind auch die Chancen, derart geschädigte Keime zu reaktivieren. Die Ergebnisse weisen auf spezifische Wechselwirkungen zwischen Keimart, Desinfektions- und Inaktivierungsmittel hin.

Die vergleichenden Untersuchungen ergaben eindeutig bei beiden Testkeimen höhere Rückgewinnungsraten nach Einarbeitung des Inaktivierungsmittels in den Rückkultur-Nährboden, so daß diese Methode empfehlenswert ist. Um die Koloniebildung reversibel geschädigter Keime nicht zu hemmen, ist der Zusatz von Inaktivierungsmittel möglichst niedrig zu halten.

Das Nährmedium, in welchem Mikroorganismen kultiviert werden, ist einer der wichtigsten Einflußfaktoren auf deren Eigenschaften, z.B. deren Resistenz gegenüber Desinfektionsmittel (27).

Für die Testung von Flächen- und Desinfektionsmitteln werden sowohl in den "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" der DGHM (5), als auch in den Vorschriften der Kommission für Phytopharmazie der Niederlande (14) die Testkeime auf Nährböden kultiviert. Andere Tests, z.B. der Keimträgertest der AOAC (1) und

der Kapazitätstest nach KELSEY und SYKES (12) schreiben die Verwendung flüssiger Medien vor.

VAN DE VOORDE und REYBROUCK (29) erwähnten bei ihren Bemühungen um die Standardisierung der Prüfung von Desinfektionsverfahren, daß viele Fragen zur Vorbereitung der Testkeime noch zur Klärung anstünden, u.a. auch die Art der Vorkultur. Sie verwendeten bei den in dieser Publikation beschriebenen Versuchen CSA. In einer späteren Arbeit konnte REYBROUCK (23) nach Kultur von *P. aeruginosa* auf CSA oder in CSL keinen Resistenzunterschied feststellen.

Bei unseren Testkeimen waren jedoch starke Differenzen, sowohl hinsichtlich der "natürlichen", als auch der desinfektionsmittelbedingten Reduktionsrate nachweisbar. Die Bestimmung der "natürlichen Absterberate" ergab keimspezifisch unterschiedliche Resultate. Die Ergebnisse der Prüfung mit 3 Desinfektionsmittelstandards und 2 Testkeimarten lassen insgesamt den Einfluß einer Präparatspezifität stärker hervortreten als den einer Keimspezifität. Nach Phenoleinwirkung erwiesen sich z.B. die auf CSA kultivierten Keime resistenter als jene in CSL, gegenüber einer Aldehydbehandlung verhielten sich die Keime von CSA und CSL etwa gleich widerstandsfähig. Lediglich die Prüfung mit dem Jodophor-Standard ergab einen vorwiegend keimspezifischen Unterschied. Staphylokokken waren resistenter nach Kultur auf CSA, Klebsiellen verhielten sich umgekehrt.

Dennoch sprechen die Ergebnisse für eine generelle Verwendung von CSA als Kulturmedium. Nur in einzelnen Fällen, wie z.B. Testung eines Jodophor-Präparates mit Klebsiellen, dürfte CSL zuverlässigere Ergebnisse liefern. Es ist aber zu empfehlen, diesen möglicherweise

nachteiligen Einzelfall zugunsten der Einheitlichkeit, deren Ziel die Standardisierung einer Prüfmethode ist, in Kauf zu nehmen.

Über den Effekt unterschiedlicher relativer Luftfeuchte (= r.F.) auf die "natürliche Absterberate" von Bakterien wurden schon viele Untersuchungen durchgeführt, deren Resultate allerdings zum Teil recht widersprüchlich sind. Sowohl in Aerosol-, als auch in Flächenversuchen ließ sich eine direkte Relation zwischen Erhöhung der r.F. und den Absterberaten nachweisen (8, 13, 15, 24, 28, 30).

In anderen Experimenten (7) wurde bei 50% r.F. die höchste Absterberate festgestellt (d.h. nach Exposition bei höherer oder niedrigerer Feuchte waren hier mehr KBE rückgewonnen worden). Es liegen aber auch Berichte über höchste Rückgewinnungsraten in feuchter Atmosphäre vor (10). Die konträren Ergebnisse der Arbeiten von MCDADE und HALL (16, 17) sowie DUNKLIN und PUCK (7) sind wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß sich die Methoden sowohl in der Auswahl der Testkeime, in der Art der Einstellung der gewünschten Feuchte, dem Rückgewinnungsverfahren der Keime, als auch in der Form der Durchführung als Flächen- (16, 17) bzw. Aerosol-Test (7) unterscheiden.

RATHMACHERS und BORNEFF (19) bestimmten die Keimzahländerung von Staph. aureus und E. coli, angetrocknet auf Oberflächen in den 2 h zwischen den Expositionszeiten von 60 und 180 min bei unterschiedlichen relativen Feuchten. Die Zahl der KBE von Staph. aureus verminderte sich in diesem Zeitraum bei 35% r.F. um ca. 0,3 Zehnerlogarithmen, bei 75% nur um 0,09. Keinen Unterschied fanden die Autoren bei E. coli, sowohl bei 35, als auch bei 75% betrug die Reduktion 0,35 Zehnerpotenzen. Eine Zunahme der Luftfeuchte wirkte sich

gegen *Staph. aureus* stärker nach 60 als nach 180 min Exposition aus. Bei Testung mit *E. coli* war hingegen auch noch nach 180 min eine höhere Absterberate feststellbar (19).

Auch in den hier beschriebenen Versuchen mit *Staph. aureus* zeigten sich die stärksten KBE-Differenzen bei unterschiedlicher Feuchte nach 1 h. Nach Exposition bei unterschiedlicher r.F. wird ferner die Zahl der rückgewinnbaren Keime durch die Art des Subkulturmediums verändert. Während der Absterbevorgänge kommt es zu Störungen des Zellstoffwechsels, wie der Hemmung bestimmter Enzyme, deren Art und Ausmaß auch von der Höhe der r.F. bestimmt wird (6, 11).

Zweifellos werden diese Alterationen durch das Verdünnungsmittel (z.B. WSH) und das Suspensionsmedium der Keime beeinflusst. Die unterschiedlichen Schädigungen können offenbar bei der Rückgewinnung durch Einsatz eines optimalen Mediums zum Teil repariert werden. In diesem Zusammenhang ist schließlich hervorzuheben, daß ein besonders nährstoffreicher Nährboden keinesfalls eine optimale Ausbeute an geschädigten Keimen liefern muß (6).

Die Beeinflussung der Absterbevorgänge durch verschiedene r.F. ist keinspezifisch. Die Schwankungen der Überlebenszeit sind von Stamm zu Stamm einer Keimart oft größer als zwischen 2 Arten (6, 9). Insgesamt wurde bei *Klebs. pneumoniae* mit der hier angewandten Methodik die geringste "natürliche Absterberate" bei 25% r.F. erzielt; eine Zunahme verminderte die Rückgewinnungsrate beträchtlich. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von RATHMACHERS und BORNEFF (19) beschriebenen Befunden. Auf *Staph. aureus* wirkte sich die Änderung der Luftfeuchte weit geringer aus.

Zeigten sich schon bei der "natürlichen Absterberate" unterschiedliche Rückgewinnungsraten bei grampositiven und -negativen Bakterien in Abhängigkeit von der Feuchte und dem Kulturmedium, so erschwerte die Applikation von Desinfektionsmitteln die Beurteilung nochmals erheblich. Erwartungsgemäß ergaben sich für die einzelnen Standards teilweise starke, keimspezifische Differenzen in der Wirksamkeit bei wechselnder r.F.. Es ist anzunehmen, daß der Grad der Verdampfung bestimmter Substanzen aus den Gemischen und damit das Ausmaß der Anreicherung einzelner Wirkstoffe von der r.F. abhängt. Die Annahme wird unter anderem durch die Beobachtung gestützt, daß sich nach Einwirkung des Aldehydgemisches während verschiedener Einwirkungszeiten jeweils eine optimale Keimausbeute bei anderen r.F. zeigte. Dies kann auf verschieden starker Reaktivierung unterschiedlich geschädigter Keime beruhen (die Denaturierung infolge Aldehydreaktion mit Aminogruppen ist abhängig vom Wassergehalt); denkbar ist aber auch eine unterschiedlich starke Inaktivierung von Aldehydresten, da diese - bedingt durch den Gehalt an Lösungsmittel - zur Ausbildung verschiedener Polymerisationsprodukte neigen. In die Wechselbeziehung zwischen Desinfektionsmittelwirkung und Feuchte greift zusätzlich noch die Art des Rückgewinnungsmediums ein. Die Applikation des Desinfektionsmittels bewirkt, neben den Veränderungen in der Struktur der Zelle - wiederum in Abhängigkeit von der r.F. - noch andersartige Alterationen der Mikroorganismen, deren Effekt und damit Reversibilität außerdem zeitabhängig sind.

Unter Berücksichtigung aller Faktoren erbrachten die Untersuchungen auch nach Einwirkung der 3 Desinfektionsmittel-Standards die höchsten Rückgewinnungsraten bei einer relativen Feuchte von 25%. Da sich dieser Bereich

auch als optimal in den Kontrollen erwiesen hatte, ist er für die Prüfung unter praxisnahen Bedingungen zu empfehlen. Reproduzierbare Untersuchungen erfordern daher die Lagerung der Keimträger während des Versuches in einem klimatisierten Bereich (Klimakammer, -raum o.ä.).

Die Empfehlung einer standardisierten Methode zur Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen war auf Grund der oben diskutierten Ergebnisse nunmehr möglich geworden.

Eine solche Methode muß der Forderung nachkommen, Koloniezahlreduktionen verschiedener Testorganismen durch unterschiedliche Konzentrationen bestimmen und eine Darstellung des Verlaufs von Wirkungskurven in Abhängigkeit von der Konzentration des Desinfektionsmittels, der Zeit und des Testkeimes geben zu können (34).

Die abschließende Versuchsserie zur Ermittlung derjenigen Konzentration der 3 Desinfektionsmittel-Standards, welche eine Keimzahlreduktion von  $10^5$  bewirkt, zeigte, daß die nun standardisierte Methode dieser Forderung in ausreichendem Maße nachkommt. Eine einfache Durchführbarkeit, ein geringer Arbeitsaufwand bei Testung mehrerer Keimarten und ein niedriges Risiko beim Umgang mit Krankheitserregern sind gewährleistet.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen lassen daher die Empfehlung folgender Methode zur Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen zu.

## 7.0 Empfehlungen

Die Eignung der "Rodac"-Methode zum Nachweis der rückgewinnbaren Keime mit 3-maligem Abdruck der Keimträger für die Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter

praxisnahen Bedingungen hat sich, entsprechend früherer Untersuchungen (4, 35), bestätigt.

Den bereits getroffenen Festlegungen der Methodik (19, 35) lassen sich nun auf Grund der in der Diskussion getroffenen Aussagen als weitere Standardisierungen folgende Empfehlungen hinzufügen:

1. Einsatz des Inaktivierungsmittels nur als "Rodac"-Nährboden-Zusatz.
2. Vorkultur der Testkeime auf CSA.
3. Konstanthalten der relativen Luftfeuchte von  $25 \pm 5\%$  während der Antrocknung der Testkeime wie auch während der Einwirkung des Desinfektionsmittels.

#### 8.0 Zusammenfassung

Zur Entwicklung einer standardisierten Methode zur Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen sind umfangreiche Untersuchungen erforderlich.

Nach Überprüfung der Eignung des Abdruckverfahrens mit der "Rodac"-Methode und Festlegung mehrerer Einzelheiten der Methodik wurden in dieser Arbeit weitere Faktoren untersucht, welche die Rückgewinnungsrate der Testkeime sowohl als "natürliche Absterberate", als auch desinfektionsmittelbedingt beeinflussen. In dieser Testserie erfolgten alle Versuche mit Staph. aureus und Klebs. pneumoniae als Testkeime unter Einsatz von 3 Desinfektionsmittel-Standards (Phenol-, Aldehydgemisch und Jodophor).

Die erste Testreihe galt der Ermittlung einer optimalen Methode zur Applikation der Inaktivierungsmittel. Geprüft wurden die drei in Frage kommenden Möglichkeiten, und zwar a) Aufsprühen von Inaktivierungsmittel

und Abdruck mit Nährböden ohne einen solchen Zusatz, b) Aufsprühen von Inaktivierungsmittel und Abdruck mit Nährböden, die Inaktivierungsmittel enthielten, sowie c) Abdruck mit inaktivierungsmittelhaltigen Nährböden ohne vorheriges Besprühen der Keimträger.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluß der Vorkultur der Testkeime auf ihre Resistenz gegenüber Austrocknung und Desinfektionsmittelwirkung untersucht. Als Kulturmedium dienten Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar (CSA) und Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (CSL).

In einer dritten Testreihe wurde der Einfluß unterschiedlicher Luftfeuchte ( $25 \pm 5$ , 50 und 80%) auf die "natürliche Absterberate" und die Desinfektionsmittelwirkung bestimmt.

Die Resultate zeigten, daß der mechanische Effekt des Besprühens im Sinne einer Verdünnung oder Entfernung der Keime vernachlässigbar klein ist, jedoch bedeutet die Applikation des Inaktivierungsmittels auf die Keimträger eine zusätzlich starke Noxe, sowohl für die durch Trocknung, als auch für die infolge Desinfektionsmittelwirkung geschädigten Keime.

Die Vorkultur auf CSA erbrachte geringere "natürliche Absterberaten" von Staph. aureus, während sich Klebsiellen als weniger beeinflusbar erwiesen. Die Ergebnisse der Prüfung der 3 Desinfektionsmittelstandards ließen insgesamt den Einfluß einer Präparatspezifität stärker hervortreten als den einer Keimspezifität: Nach Phenoleinwirkung erwiesen sich die auf CSA bebrüteten Keime resistenter als nach Kultur in CSL, gegenüber einer Aldehydbehandlung verhielten sich die unterschiedlich kultivierten Keime etwa gleich. Die Prüfung mit dem Jodophor ergab dagegen

einen keimspezifischen Unterschied, Staphylokokken waren resistenter nach Kultur auf CSA, Klebsiellen verhielten sich umgekehrt.

Mit 25% relativer Luftfeuchte waren die geringsten "natürlichen Absterberaten" bei Klebs. pneumoniae festzustellen. Auf Staph. aureus wirkte sich die Feuchte geringer aus. Zwar zeigte sich bei der Testung mit den 3 Desinfektionsmittel-Standards eine starke Präparat- und Keimspezifität, doch erwies sich insgesamt eine relative Feuchte von 25% als optimal zur Erzielung höchster Rückgewinnungsraten.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Versuche sind folgende methodische Bedingungen zu empfehlen:

1. Einsatz des Inaktivierungsmittels nur als "Rodac"-Nährboden-Zusatz.
2. Vorkultur der Testkeime auf CSA.
3. Konstanthalten der relativen Luftfeuchte von  $25 \pm 5\%$  während der Antrocknung der Testkeime wie auch während der Einwirkung des Desinfektionsmittels.

In einer anschließenden Versuchsserie wurde die auf Grund der Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen festgelegte Methode angewandt zur Bestimmung von Grenzkonzentrationen der 3 Desinfektionsmittel-Standards, wobei Staph. aureus, Klebs. pneumoniae, Strept. faecium und E. coli als Testkeime dienten.

Die Methode erlaubt in dieser standardisierten Form zuverlässige Aussagen über ein Präparat in seiner quantitativen Wirksamkeit, wobei eine einfache Durchführbarkeit, ein geringer Arbeitsaufwand und ein niedriges Risiko beim Umgang mit Krankheitserregern gewährleistet sind.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit lassen die Empfehlung dieser Methode zur Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren unter praxisnahen Bedingungen zu.

### 3.0 Literaturverzeichnis

1. Association of Official Analytical Chemists: Use-Dilution-Method. J. Ass. Off. Analyt. Chem. 53 (1970) 61
2. BORNEFF, J., H.-P. WERNER and M. DUPPRÉ: Investigations on the Efficacy of Surface Disinfection and Surface Cleaning Methods. 3. Evaluation of the Results of In-Use and Laboratory Tests. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 160 (1975) 579
3. BORNEFF, J., H.-P. WERNER, H. VAN DE VOORDE und G. REYBROUCK: Kritische Beurteilung der Prüfmethoden für chemische Desinfektionsmittel und -verfahren. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 160 (1975) 596
4. BORNEFF, M.: Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. 2. Vergleichsversuche mit der Abdruck- und Abspülmethodik. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 11
5. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel". 3. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1972)
6. DIMMICK, R.L.: Damage and Repair of Bacteria in Air. aus: PELS, J.P.P.H. and K.C. WINKLER: "Airborne Transmission and Airborne Infection." Oosthoek Publishing Company, Utrecht, The Netherlands (1973)
7. DUNKLIN, E.W. and T.T. PUCK: The Lethal Effect of Relative Humidity on Airborne Bacteria. J. exp. Med. 87 (1948) 87
8. GUNDERMANN, K.O.: Untersuchungen zur Lebensdauer von Bakterienstämmen in Staub unter dem Einfluß unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 156 (1972) 422
9. HARRIS, N.D.: The Influence of the Recovery Medium and the Incubation Temperature on the Survival of Damaged Bacteria. J. appl. Bact. 26 (1963) 387
10. HELLAT, A.: Studies on the Self-Disinfecting Power of the Skin. Ann. exp. Med. Biol. Fenn. 26, Suppl. 8 (1948) 1
11. HELLER, G.: A Quantitative Study of Environmental Factors Involved in Survival and Death of Bacteria in the Desiccated State. J. Bact. 41 (1941) 109
12. KELSEY, J.C. and G. SYKES: A New Test for the Assessment of Disinfectants with Particular Reference to their Use in Hospitals. Pharmac. J. 202 (1969) 607

13. KETHLEY, T.W., E.L. FINCHER and W.B. COWN: The Effect of Sampling Method upon the Apparent Response of Airborne Bacteria to Temperature and Relative Humidity. *J. infec. Dis.* 100 (1957) 97
14. Kommission für Phytopharmacie: Wertbestimmung von zur Verwendung in der Lebensmittelindustrie bestimmten Desinfektionsmitteln und kombinierten Reinigungs-Desinfektionsmitteln. *Niederlande* (1972)
15. LIDWELL, O.M. and E.J. LOWBURY: The Survival of Bacteria in Dust. II. The Effect of Atmospheric Humidity on the Survival of Bacteria in Dust. *J. Hyg.* 48 (1950) 21
16. MCDADE, J.J. and L.B. HALL: Survival of Staph. aureus in the Environment. I. Exposure on Surfaces. *Amer. J. Hyg.* 78 (1963) 330
17. MCDADE, J.J. and L.B. HALL: Survival of Gram-negative Bacteria in the Environment. I. Effect of Relative Humidity on Surface Exposed Organisms. *J. Hyg.* 80 (1964) 192
18. MOSSEL, D.A.A. and I.G.A. HARREWIJN: Evaluation of Disinfectants under Practical Conditions using Tiles as Carriers. *Comm. voor Fytofarmacie* (1972)
19. RATHMACHERS, B. und M. BORNEFF: Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. 4. Natürliche Absterberaten und deren Beeinflussung durch Umgebungsfaktoren. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 165 (1977) 43
20. REBER, H.: Desinfektion: Vorschlag für eine Definition. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 157 (1973) 11
21. REYBROUCK, G.: Über die Standardisierung der Wertbestimmung von Flächendesinfektionsmitteln. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 158 (1974) 465
22. REYBROUCK, G.: A Theoretical Approach of Disinfectant Testing. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 160 (1975) 342
23. REYBROUCK, G.: Factors Influencing the Assessment of the Pseudomonacidal Activity of Disinfectants by a Quantitative Suspension Test. I. Influence of the Growth Conditions of the Test Organism. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 165 (1977) 102
24. ROBERTSON, O.H., E.W. DUNKLIN, T.T. PUCK and W. LESTER: The Influence of Relative Humidity on the Survival of Respiratory Pathogens Dispersed into the Environment. *Trans. Ass. Amer. Physns.* 61 (1948) 280

25. SCHMIDT, B.: Das 2. Internationale Colloquium über die Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in Europa. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 157 (1973) 1
26. STEDMAN, R.L., E. KRAVITZ and H. BELL: Studies on the Efficiencies of Disinfectants for Use on Inanimate Objects. I. Relation Activities on a Stainless Steel Surface using a New Performance Test Method. Appl. Microbiol. 2 (1954) 119
27. SYKES, G.: Disinfection and Sterilization. 2nd ed. E. and F.N. Spon Ltd., London (1965)
28. TURNER, A.G. and P.A. SALMONSEN: The Effect of Relative Humidity on the Survival of Three Serotypes of Klebsiella. J. appl. Bact. 36 (1973) 497
29. VAN DE VOORDE, H. und G. REYBROUCK: Erfahrungen bei der Standardisierung von Prüfungsmethoden. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 157 (1973) 132
30. WALTER, G. and S. FORIS: Antibacterial Residuals on Inanimate Surfaces. Soap Chem. Spec. 39 (1963) 77
31. WERNER, H.-P.: Investigations on the Efficacy of Surface Disinfection and Surface Cleaning Procedures. 2. Laboratory Testing of the Efficacy under Conditions Simulating those of Real-Life. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 160 (1975) 568
32. WERNER, H.-P., M. BORNEFF und J. BORNEFF: Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. 1. Literaturübersicht über die bisherigen Laboratoriumsmethoden. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 1
33. WERNER, H.-P., B. RATHEMACHERS und J. BORNEFF: Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. 5. Bestimmung der Keimreduktion durch die Desinfektion. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 60
34. WERNER, H.-P., G. REYBROUCK und G. WERNER: Ein Vergleich der Ergebnisse von 4 nationalen Methoden zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in 2 Laboratorien. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 160 (1975) 368
35. WERNER, H.-P., U. SWINKE und G. WERNER: Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. 3. Die Keimrückgewinnungsraten beim Abdruckverfahren in Abhängigkeit vom Material und der Keimart. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 165 (1977) 20

## 10.0 Abkürzungen

CSA: Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar  
CSL: Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung  
DIM: Desinfektionsmittel  
KBE: Koloniebildende Einheit  
R.F.: Relative Feuchte  
WSH: Wasser standardisierter Härte

Herrn Prof. Dr. J. Borneff möchte ich für die Überlassung des Themas und,  
ebenso wie Herrn Prof. Dr. H.-P. Werner, für hilfreiche Beratung danken.

Fräulein Müller-Späth und Fräulein Grünhage gilt mein Dank für die  
Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit.



## Lebenslauf

Am 17. 11. 1947 wurde ich als Tochter von Frau Helma Menzel, geborene Popp, und Herrn Georg Menzel in Kiel geboren.

1955 siedelten wir nach Mainz über. Nach 4 Jahren Volksschulausbildung besuchte ich das Frauenlob-Gymnasium Mainz, wo ich am 25. 10. 1966 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Psychologie und Philosophie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz und wechselte im Sommersemester 1968 zum Studienfach Medizin. Nach Bestehen des Vorphysikums am 31. 3. 1969 und des Physikums am 5. 4. 1971 legte ich am 24. 7. 1975 das Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit in der Chirurgie leistete ich am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Trier ab. Die Jahre 1977/78 verbrachte ich in Australien und Neuseeland, wo ich ebenfalls ärztlich tätig war.

Seit dem 1. 9. 1979 arbeite ich als Medizinalassistentin auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Husum.







**REPRO  
LÜDKE**

BEIDER UNI  
TEL. 44 62 17/44 71 72  
SCHLÜTERSTRASSE 50-54  
2000 HAMBURG 13